

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů



Mgr. Jitka Škrabalová

Studium molekulárních mechanismů kardioprotektivního působení morfinu

Studies on the molecular mechanisms of cardioprotective effects of morphine

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2018

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně na základě konzultací se svým školitelem doc. RNDr. Jiřím Novotným, DSc., vedoucím Skupiny membránových receptorů a buněčné signalizace, Katedry fyziologie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 12. 6. 2018

.....

Mgr. Jitka Škrabalová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc, za jeho dlouholeté odborné vedení a vstřícný přístup. Poděkování patří také RNDr. Zdeňce Drastichové, Ph.D za možnost spolupráce a cenné rady v začátcích mého studia. Déle děkuji Mgr. Kláře Hahnové za sdílení stolu a všech úskalí a radostí doktorského studia, Mgr. Barboře Melkes za to, že dala celému mému studiu hlubší smysl, RNDr. Lucii Hejnové, Ph.D za zodpovězení nesčetných dotazů, výpočty a za to, že nás drží v bezpečí před radioaktivitou, Mgr. Ivče Markové za motivaci, talentované cytometristce Míše Hájkové, Ph.D, bez jejíž pomoci bych nikdy nenaměřila tak hezká data, dvojčatům Mgr. Radce Moravcové a Mgr. Simoně Moravcové za neustálé stavy déjà vu a skvělé koláče, Mgr. Ivče Karlovské za buněčnou pomoc a příjemné spolubydlení, Mgr. Ondřeji Honcovi za to, že není nikdy pozdě, Mgr. Kamile Weissové za pomoc v práci, díky které jsem měla více času na psaní, celému kolektivu laboratoří katedry fyziologie a imunologie za příjemné pracovní prostředí a sekretářkám Janě Klimentové a Zuzce Soukupové za jejich dokonalost. Velké poděkování patří také mé rodině a kamarádům, kteří mě podporovali po celou dobu studia. Et merci beaucoup Chris pour ton soutien, amour et compréhension quand je devais écrire même lorsque nous avions peu de temps pour nous.

Ráda bych také poděkovala za finanční podporu, kterou mi poskytla Grantová agentura Univerzity Karlovy (projekt č. 429511 a 361615) a nadace „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“, která financovala mé cestovní náklady na konference GPCRs: Beyond Structure Towards Therapy (Prato) a 42nd FEBS Congress "From molecules to cells and back (Jeruzalém) a cestovní výdaje spojené se zahraniční stáží na University of Zurich.

Abstrakt

Akutní i chronické podávání morfinu dokáže u potkanů výrazně snížit ischemicko-reperfuční poškození srdce. Molekulární mechanismy zprostředkovávající protektivní působení morfinu však nejsou dodnes zcela objasněny. Zároveň existuje jen velmi málo poznatků o důsledcích dlouhodobého působení morfinu na srdeční tkáň.

V první části projektu jsme se proto zaměřili na zkoumání vlivu dlouhodobého podávání vysokých dávek morfinu (10 mg/kg/den, 10 dní) na srdeční tkáň potkana. Ve druhé části projektu jsme zkoumali vliv 1 mM morfinu na viabilitu a redoxní stav buněčné linie potkaních kardiomyoblastů H9c2, u které byl vyvolán oxidativní stres působením 300 μ M *tert*-butylhydroperoxidu (*t*-BHP).

Naše experimenty ukázaly, že dlouhodobé podávání morfinu neovlivnilo množství a afinitu myokardiálních β -adrenergických receptorů (β -AR), ale téměř zdvojnásobilo množství dominantní izoformy myokardiální adenylylcyklázy (AC) V/VI a vedlo k supersenzibilizaci AC. Proteomické analýzy současně odhalily, že dlouhodobé podávání morfinu bylo spojené s výraznými změnami proteomu levé srdeční komory. Docházelo přitom především ke zvýšení exprese heat shock proteinů (HSP). Zvýšená exprese HSP27 byla současně doprovázena zvýšenou fosforylací tohoto proteinu, přičemž míra fosforylace byla nejvyšší 3 dny po ukončení podávání morfinu a 6. den se navrátila na kontrolní hladinu. Naopak žádné změny nebyly pozorovány v expresi proteinů, které jsou zapojeny do regulace oxidativního stresu.

Ve druhé části projektu jsme ukázali, že 1 mM morfin dokáže významně ochránit buněčnou linii H9c2 před oxidativním stresem, který byl vyvoláván působením *t*-BHP. Protektivní působení morfinu bylo přinejmenším částečně zprostředkováno současnou aktivací signálních drah p38 MAPK a PI3K/GSK-3 β . Morfin zároveň zvýšil celkovou antioxidační kapacitu buněk a snížil karbonylaci proteinů, peroxidaci lipidů a celkové množství volných kyslíkových radikálů. Preinkubace s morfinem pak snížila negativní dopad *t*-BHP na všechny výše popsané parametry redoxního stavu buněk.

V souhrnu naše experimenty ukazují, že dlouhodobé podávání vysokých dávek morfinu potkanům výrazně ovlivňuje myokardiální AC signalizaci a vede k četným změnám v proteomu srdeční tkáně. V in vitro podmínkách může morfin vykazovat silné antioxidační účinky a dokáže významně ochránit H9c2 buňky před oxidativním stresem.

Klíčová slova: morfin, srdce, proteomika, adenylylcykláza, heat shock proteiny, H9c2 buňky, oxidativní stress, PI3K, GSK-3 β , p38 MAPK

Abstract

Acute and chronic morphine administration can significantly reduce ischemia-reperfusion injury of the rat heart. However, the molecular mechanisms mediating the protective effect of morphine are not yet fully elucidated. Concurrently, there is a lack of information about the effects of the long-term action of morphine on heart tissue.

Therefore, in the first part of the project, we studied the effect of long-term administration of high doses of morphine (10 mg/kg/day, 10 days) on rat heart tissue. In the second part of the project, we investigated the effect of 1 mM morphine on viability and redox state of rat cardiomyoblast cell line H9c2 that was influenced by oxidative stress elicited by exposure to 300 μ M *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP).

Our experiments have shown that long-term morphine administration affected neither the amount nor the affinity of myocardial β -adrenergic receptors (β -AR), but almost doubled the number of the dominant isoforms of myocardial adenylyl cyclase (AC) V/VI and led to supersensitization of AC. At the same time, proteomic analyses revealed that long-term morphine administration was associated with significant changes in the left ventricular proteome. In particular, there was an increase in the expression of heat shock proteins (HSP). Increased expression of HSP27 was concomitantly accompanied by increased phosphorylation of this protein. Whereas, after a 3-days drug abstinence phosphorylation of HSP27 further increased, after a 6-days abstinence its phosphorylation returned to the control level. Conversely, there were no alterations in the levels of proteins involved in the regulation of oxidative stress.

In the second part of our project, we have shown that 1 mM morphine can significantly protect the H9c2 cell line against oxidant injury induced by *t*-BHP. This protective effect of morphine was at least partially mediated by the simultaneous activation of the p38 MAPK and PI3K/GSK-3 β signaling pathways. Morphine also increased the total antioxidant capacity of cells and reduced protein carbonylation, lipid peroxidation and production of reactive oxygen species. Preincubation with morphine reduced the negative impact of *t*-BHP on all the parameters of cellular redox state described above.

In summary, our experiments show that long-term administration of high doses of morphine to rats significantly affects myocardial AC signaling and leads to numerous changes in the cardiac tissue proteome. In vitro, morphine may have strong antioxidant effects and can considerably protect H9c2 cells against the oxidative stress.

Keywords: morphine, heart, proteomics, adenylyl cyclase, heat shock proteins, H9c2 cells, oxidative stress, PI3K, GSK-3 β , p38 MAPK

Obsah

Seznam zkratk.....	8
Pojmy.....	12
1. Úvod.....	13
2. Literární přehled.....	14
2.1. Morfin.....	14
2.1.1. Chemická struktura.....	15
2.1.2. Metabolismus a farmakokinetika.....	15
2.1.3. Vedlejší účinky.....	17
2.2. Endogenní opioidní peptidy.....	21
2.3. Opioidní receptory.....	22
2.3.1. Typy opioidních receptorů.....	22
2.3.2. Distribuce opioidních receptorů.....	24
2.3.3. Opioidní receptory jakožto součást rodiny GPCR.....	26
2.3.4. Efektory opioidních receptorů.....	27
2.3.4.1. Adenylylcykláza.....	28
2.3.4.2. Fosfolipáza C β	29
2.3.4.3. Iontové kanály.....	30
2.3.4.4. Fostatidylinositol-3-kináza.....	30
2.3.4.5. Mitogenem aktivované proteinkinázy.....	31
2.3.5. Desenzitizace a internalizace.....	32
2.4. Toll-like receptory.....	36
2.5. Ischemicko-reperfuzní poškození myokardu.....	38
2.6. Kardioprotektivní působení morfinu.....	41
2.6.1. Úloha EOP v ischemickém preconditioningu.....	41
2.6.2. Morfinový conditioning.....	41
2.6.2.1. Otevírání mitochondriálních ATP senzitivních K ⁺ kanálů a produkce ROS.....	43
2.6.2.2. Aktivace PKC.....	44
2.6.2.3. Inhibice GSK-3 β a otevírání mPTP.....	45
2.6.2.4. JAK/STAT signální dráha.....	46

2.6.2.5. Crosstalk s dalšími receptory.....	47
2.6.2.6. MikroRNA.....	47
2.6.2.7. Morfinový preconditioning.....	48
2.6.2.8. Imunosupresivní vlastnosti morfinu.....	50
2.6.3. Chronický morfinový preconditioning.....	51
2.6.4. Morfinový conditioning na dálku.....	52
2.6.5. In vivo lidské studie.....	54
3. Cíle práce.....	57
3.1. Přehled specifických cílů.....	57
3.1.1. Model in vivo, potkan kmene Wistar.....	57
3.1.2. Model in vitro, buněčná linie potkaních kardiomyoblastů H9c2.....	58
4. Seznam vlastních publikací.....	59
4.1. Seznam použitých publikací.....	59
4.2. Seznam ostatních publikací.....	59
4.3. Podíl na použitých publikacích.....	60
5. Seznam metod.....	61
5.1. Experimentální model in vivo.....	61
5.1.1. Elektroforéza a imunobloting.....	61
5.1.2. Saturační vazebné studie.....	61
5.1.3. Stanovení enzymové aktivity AC.....	62
5.2. Experimentální model in vitro.....	62
5.2.1. Testování přežívání buněk.....	63
5.2.1.1. MTT test.....	63
5.2.1.2. LDH test.....	63
5.2.1.3. Značení Annexin V/Hoechst 33258.....	63
5.2.2. Stanovení redoxního stavu buněk.....	64
5.2.2.1. Celková antioxidační kapacita.....	64
5.2.2.2. Stanovení intracelulární hladiny ROS.....	64
5.2.2.3. Karbonylace proteinů.....	64
5.2.2.4. Peroxidace lipidů.....	64

5.2.3. Elektroforéza a imunobloting.....	65
5.3. Analýza dat.....	65
 6. Výsledky.....	 66
6.1. Antiarytmický efekt dlouhodobého působení morfinu je u potkanů doprovázen změnami v myokardiální signalizaci adenylcyklázy.....	66
6.2. Dlouhodobé podávání morfinu mění expresi proteinů v srdeční tkáni potkanů	67
6.3. Globální změny v proteomu srdeční tkáně potkanů indukované dlouhodobým podáváním morfinu a jeho následným vysazením.....	68
6.4. Morfin navozuje protekci proti oxidativnímu stresu v buněčné linii potkaních kardiomyoblastů H9c2.....	69
 7. Diskuze.....	 70
 8. Závěr.....	 84
8.1. Model in vivo – potkan kmene Wistar.....	84
8.2. Model in vitro – buněčná linie potkaních kardiomyoblastů H9c2.....	85
 9. Seznam použité literatury.....	 87
 10. Přílohy - Seznam publikací <i>in extenso</i>.....	 121
10.1. Příloha A: Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenyl cyclase signaling in rats	
10.2. Příloha B: Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium	
10.3. Příloha C: Global changes in the rat heart proteome induced by prolonged morphine treatment and withdrawal	
10.4. Příloha D: Protective effect of morphine against the oxidant-induced injury in H9c2 cells	

Seznam zkratk

A...

β -AR	β -adrenergní receptor
ALDH2	aldehyddehydrogenáza 2
AR	adenosinový receptor
ATP	adenosintrifosfát
AC	adenylylcykláza
Akt	kináza, označovaná také jako proteinkináza B

C...

cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CaM	kalmmodulin
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CGRP	peptid příbuzný genu pro kalcitonin (calcitonin gene-related peptide)
CNS	centrální nervová soustava
CPB	kardiopulmonární bypass
CRE	cAMP responzivní element (cAMP response element)
CREB	proteinu vázající cAMP responzivní element (cAMP response element binding protein)

D...

DADLE	D-Ala ² , D-Leu ⁵]-enkefalin
DAG	diacylglycerol
DCFH	2',7'-dichlorohydrofluorescein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
DOR	delta opioidní receptor

E...

ECS	extracelulární smyčka
EGFRTK	tyrozinkinázové receptory pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor tyrosine kinase)
EOP	endogenní opioidní peptidy
ERK	kinázy regulované extracelulárním signálem (extracellular signal-regulated kinases)

ET	endotelin
F...	
FBS	fetální bovinní sérum
G...	
G-protein	regulační protein vázající guaninové nukleotidy
GC	guanylylcykláza
GDP	guanosindifosfát
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem (G protein-coupled receptor)
GRK	G-protein vázající receptorové kinázy (G protein-coupled receptor kinases)
GRP78	glukózou regulovaný protein
GSK-3 β	glykogen syntáza kináza-3 β
GTP	guanosintrifosfát
GSHPx	glutathion peroxidáza
H...	
HSC70	protein příbuzný heat shock proteinu 70, synonymum HSPA8 (heat shock cognate 71 kDa protein)
HSP	heat shock protein (protein tepelného šoku)
H ₂ DCF-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
CH...	
ChMPC	chronický morfinový preconditioning
I...	
ICAM-1	intracelulární adhezivní molekula 1
ICHs	ischemická choroba srdeční
ICS	intracelulární smyčka
i.m.	intramuskulární
IPC	ischemický preconditioning
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfát
I-R	ischemicko-reperfuzní
i.t.	intratekální
iTRAQ	izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci (isobaric tag for relative and absolute quantitation)

i.v.	intravenózní
J...	
JAK	janus tyrozinkináza
JIP	jednotka intenzivní péče
JNK	c-Jun N-terminální kinázy
K...	
KOR	kappa opioidní receptor
L...	
LDH	laktátdehydrogenáza
LPS	lipopolysacharid
M...	
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MAPKK	kináza mitogenem aktivované proteinkinázy
MAPKKK	kináza kinázy mitogenem aktivované proteinkinázy
MD-2	myeloidní diferenciační protein 2
miRNA	mikroRNA
mitoK _{ATP} kanály	mitochondriální ATP senzitivní K ⁺ kanály
mitoK _{Ca} kanály	mitochondriální Ca ²⁺ senzitivní K ⁺ kanály
MnCl ₂	chlorid manganatý
MOR	mí opioidní receptor
MPC	morfínový preconditioning
MPOC	morfínový postconditioning
mPTP	mitochondriální póry přechodné permeability (mitochondrial permeability transition pore)
mTOR	kináza, „mammalian target of rapamycin“
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MVP	major vault protein
M3G	morfín-3-glukuronid
M6G	morfín-6-glukuronid
N...	
NaF	fluorid sodný
NEP	neutrální endopeptidáza

NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NMDAR	N-methyl-D-aspartátový receptor
NO	oxid dusnatý
NOR	receptor pro nociceptin/orphanin FQ opioidní peptid
NOS	syntáza oxidu dusnatého
O...	
OR	opiooidní receptor
ORP150	kyslíkem regulovaný protein (oxygen regulated protein)
P...	
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDK	fosfoinositid dependentní kináza
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bifosfát
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PITP	proteinový přenašeč fosfatidylinositolu
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PKG	proteinkináza G
PLC β	fosfolipáza C β
p.o.	perorální
PP2	protein serin/threonin fosfatáza
Prx	peroxiredoxin
PS	fosfatidylserinu
PPCI	primární perkutánní koronární intervence
Q...	
qPCR	kvantitativní PCR
R...	
RIPC	ischemický preconditioning na dálku (remote ischemic preconditioning)
RMPC	morfinový preconditioning na dálku (remote morphine preconditioning)

RMPOC	morfinový postconditioning na dálku (remote morphine postconditioning)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
RTK	tyrozinkinázové receptory
S...	
sarcK _{ATP} kanály	sarkolemální ATP senzitivní K ⁺ kanálů
SB 216763	inhibitor GSK-3β
SOD	superoxiddismutáza
SR	sarkoplazmatické retikulum
Src	kináza
STAT	signální přenašeč a aktivátor transkripce (signal transducer and activator of transcription)
STEMI	infarkt myokardu spojeným s elevací ST segmentu na ektokardiogramu (ST elevation myocardial infarction)
T...	
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxid
TLR	Toll-like receptor
TM	transmembránový α-helikální segment
TOM	transportní komplex vnější mitochondriální membrány (translocase of the outer membrane)

Pojmy:

Antinociceptivní: působící proti vedení bolestivých podnětů

Dysforie: pocit nepohody, opak euforie

Extubace: opak intubace, odstranění endotracheální rourky z průdušnice

Hyperalgezie: zvýšená vnímavost bolesti

Intratekální aplikace: podání do sub-arachnoideálního (mezi mozkové pleny pia mater a arachnoideu) prostoru míšního kanálu

Primární perkutánní koronární intervence: opětovné rozšíření koronárních cév nebo odstranění jejich úplných uzávěrů

1. Úvod

Morfin patří mezi opioidy, které lze jednoduše charakterizovat jako látky, které vyvolávají svůj efekt vazbou na opioidní receptory (OR). Morfin je znám především díky svým silným analgetickým účinkům, pro které je využíván již od 19. století. Mimořádné analgetické účinky jsou však spojené s vysokým potenciálem morfinu vyvolávat toleranci a závislost. Po vazbě na OR vyvolává morfin svůj účinek napodobováním endogenních opioidních peptidů, které jsou syntetizovány přímo v tělech živočichů, kde se zapojují do četných fyziologických regulací. V srdečních myocytech mohou endogenní opioidy modulovat signalizaci β -adrenergních receptorů (β -AR) a s ní spojenou kontraktilitu srdce. Lze proto předpokládat, že při aktivaci OR exogenním agonistou morfinem dochází k narušení rovnováhy mezi signálním systémem opioidních a adrenergních receptorů, na které musí buňka reagovat adaptačními mechanismy.

V souvislosti s objasněním mechanismů vzniku tolerance a závislosti byly účinky morfinu zkoumány především v mozkové tkáni. Srdeční tkáni se dostalo větší pozornosti až po zjištění, že podání morfinu před infarktem myokardu dokáže u potkanů výrazně snížit ischemicko-reperfúzní (I-R) poškození (Schultz *et al.*, 1996). Většina dosavadních studií je však zaměřená pouze na zkoumání akutního působení morfinu a jeho potenciální schopnosti navodit kardioprotekci. Doposud tak existuje jen poměrně málo informací o důsledcích dlouhodobého podávání morfinu na srdeční tkáň. Z tohoto důvodu bylo hlavním cílem této práce rozšířit naše vědomosti o vlivu dlouhodobého působení morfinu na srdeční tkáň potkana. Toto bádání nás později přivedlo k otázce, jaký má vliv podání morfinu na redoxní stav srdečních buněk. Ve druhé části projektu jsme se proto zaměřili na zkoumání vlivu morfinu na viabilitu a redoxní stav buněčné linie potkaních kardiomyoblastů H9c2, u které byl vyvolán oxidativní stres působením *tert*-butylhydroperoxidu (*t*-BHP). Zároveň jsme se zaměřili na identifikaci signálních drah, které mají klíčovou roli v molekulárním mechanismu protektivního působení morfinu.

2. Literární přehled

2.1. Morfin

Morfin je přirozeně se vyskytující alkaloid, který je součástí opia získaného ze šťávy nezralých makovic máku setého (*Papaver somniferum* L.). Mák setý patří k jedné z nejstarších rostlin užívaných pro lékařské účely. Pochází pravděpodobně z oblasti Malé Asie, kde byl pěstován Sumery již v období 4 000 - 3 000 let před naším letopočtem mezi řekami Eufrat a Tigris v oblasti dnešního jižního Iráku. První zmínka o pěstování máku byla zaznamenána klínovým písmem na sumerských hliněných tabulkách kolem roku 3 000 před naším letopočtem. Kromě způsobu pěstování máku je na destičkách popsáno i sbírání šťávy z nezralých makovic a následná produkce opia označovaného jako „gil“ - v překladu znamenající „štěstí“ (Schiff, 2002). Ve starověkých civilizacích bylo opium inhalováno nebo aplikováno skrze vpichy v kůži. Jeho působením docházelo k analgezii, ale zároveň také k útlumu dýchání, a jeho užívání tak mohlo vést až ke smrti.

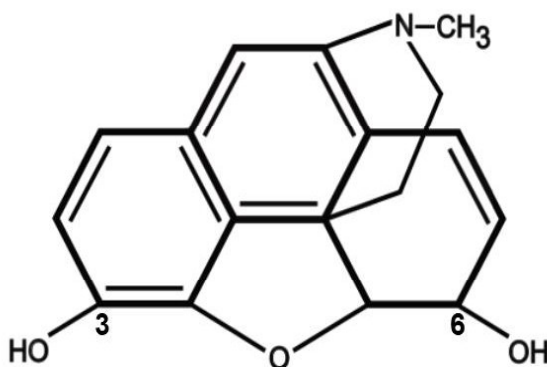
Opium je komplexní chemický koktejl, který kromě cukrů, proteinů, tuků, rostlinných vosků, pryskyřic a vody obsahuje také alkaloidy jako je morfin (10 - 15 %), kodein (1 - 3 %), noskapin (4 - 8 %), papaverin (1 - 3 %) a tebain (1 - 2 %) (Zöllner a Stein, 2006). Morfin byl z opia poprvé izolován v roce 1806 německým lékárníkem Friedrichem Sertürnerem a jeho název byl odvozen od řeckého boha snů Morfeuse. Jako běžné analgetikum začal být morfin používán již ve 30. letech 19. století (Schiff, 2002), ale k jeho většímu rozšíření v lékařské praxi došlo až po vynalezení injekční stříkačky s jehlou v 50. letech 19. století. Od té doby začal být morfin využíván i pro menší chirurgické zákroky, pooperační a chronické bolesti a jako doplnění celkové anestezie (Brownstein, 1993).

Z morfinu se postupem času stalo nejpoužívanější analgetikum a dodnes zůstává standardem, se kterým jsou porovnávány ostatní opioidy (Hamilton a Baskett, 2000). Kromě analgezie navozuje morfin i euforii, sedaci a sníženou schopnost koncentrace. Pokud je však podán v nepřítomnosti bolesti, může místo euforie navodit dysforii. Analgetické působení morfinu neodstraňuje samotnou příčinu bolesti, ale zvyšuje práh pro její percepci a modifikuje vnímání škodlivých podnětů tak, že už nadále nejsou jako bolest vnímány. Nepřetržitá tupá bolest je přitom zmírněna efektivněji než prudká bolest,

která přichází periodicky. Oproti neopioidním analgetikům je podání morfinu účinnější při tlumení bolestí, které vznikají v útrobních orgánech, kosterních svalech, kloubech a kůži (Stoelting a Miller, 2007).

2.1.1. Chemická struktura

Morfin je fenanthrenový alkaloid složený z pěti kondenzovaných cyklů (viz obr. 1). Fenolická hydroxylová skupina na pozici C3, alkoholová hydroxylová skupina na pozici C6 a terciální amin činí jinak strukturně rigidní molekulu chemicky aktivní. Díky dvěma hydrofilním – OH skupinám na pozici C3 a C6 je morfin relativně dobře rozpustný ve vodě a špatně rozpustný v tucích. Terciální amin je důležitý pro navození analgezie, pokud by byl amin přítomen v kvarterní formě, morfin by nemohl procházet do centrální nervové soustavy (CNS) a výrazně by se tak snížil jeho analgetický efekt. Morfin je opticky aktivní a pouze jeho levotočivý izomer je schopen analgezie. Obě hydroxylové skupiny mohou být konvertovány na ethery a estery, například po O-acetylaci na pozici C3 a C6 vzniká diacetylmorfin – heroin (Andersen *et al.*, 2003; Trescot *et al.*, 2008).



Obr. 1: Chemická struktura morfinu odvozená od fenanthrenu.

2.1.2. Metabolismus a farmakokinetika

Morfin je metabolizován především glukuronidací působením enzymu UGT2B7 (uridindifosfát-glukuronosyltransferáza izoformy 2B7), který katalyzuje jeho konjugaci s

glukuronovou kyselinou za vzniku morfin-3-glukuronidu (M3G) a morfin-6-glukuronidu (M6G) (Stone *et al.*, 2003). K metabolické přeměně dochází zejména v játrech a v menší míře i v mozku a ledvinách. Glukuronidy jsou poté z těla odstraňovány pomocí žluče a moči (Christrup, 1997).

Při tlumení akutních silných bolestí je morfin podáván především intravenózně (i.v.) nebo intramuskulárně (i.m.), k perorálnímu (p.o.) podání morfinu dochází zpravidla při léčbě chronických bolestí (Rang *et al.*, 2003). Po i.v. aplikaci morfinu dochází k velmi rychlému nástupu jeho efektu. Pokusné subjekty tak často mohou pociťovat jeho účinky na CNS ještě před tím, než je dokončena samotná aplikace. Spolu s rychlým nárůstem plasmatické koncentrace morfinu ale dochází i k jeho rychlé distribuci do tkání, metabolismu a exkreci (Brunk a Delle, 1974). Po i.m. podání je morfin rychle absorbován, jeho efekt nastupuje po 15 až 30 minutách a nejsilnější účinek přichází po 45 až 90 minutách. Celý analgetický efekt trvá přibližně 4 hodiny (Stoelting a Miller, 2007). Plasmatická koncentrace morfinu přitom dosahuje během 15 minut až 3 hodin po i.m. podání vyšších hodnot než při jeho i.v. aplikaci. Při p.o. podání je morfin z gastrointestinálního traktu dobře absorbován, poté je však rychle metabolizován buňkami sliznice tenkého střeva a játry, a v plasmě tak převyšují metabolity M3G a M6G nad volným morfinem (Brunk a Delle, 1974).

Bez ohledu na způsob podání je morfin konvertován z 55 % na M3G a z 10 % na M6G. Určitá část morfinu zůstává nekonvertována až do svého vyloučení močí. Při i.v. podání je to přibližně 8 %, při p.o. podání necelá 3 % morfinu. Rozdíl mezi množstvím volného morfinu by mohl vysvětlovat, proč je p.o. užití zhruba 3x méně účinné, než podání při kterém morfin neprochází trávicí soustavou (Hasselström a Säwe, 1993).

Ačkoli jsou molekuly M6G i M3G vysoce hydrofilní, mohou procházet hematoencefalickou bariérou, i když v daleko menší míře než morfin (Yoshimura *et al.*, 1973). M6G se váže na OR a vykazuje vysoký potenciál pro navození analgezie. Pokud je M6G aplikován intracerebroventrikulárně, tedy přímo do mozkové komory, jeho analgetické působení dokonce převyšuje morfin (De Gregori *et al.*, 2012). M6G navíc navozuje daleko méně nežádoucích vedlejších účinků než morfin (Lötsch *et al.*, 1996). M3G má naopak velmi malou afinitu k OR a nevykazuje žádnou analgetickou aktivitu. Působení M3G může být spojeno s neurotoxickými syndromy jako jsou hyperalgie

(zvýšená vnímavost bolesti), allodynie (vyvolání bolestivého vjemu podnětem, který za normálních okolností bolest nevyvolává) a svalové záškuby (Andersen *et al.*, 2003).

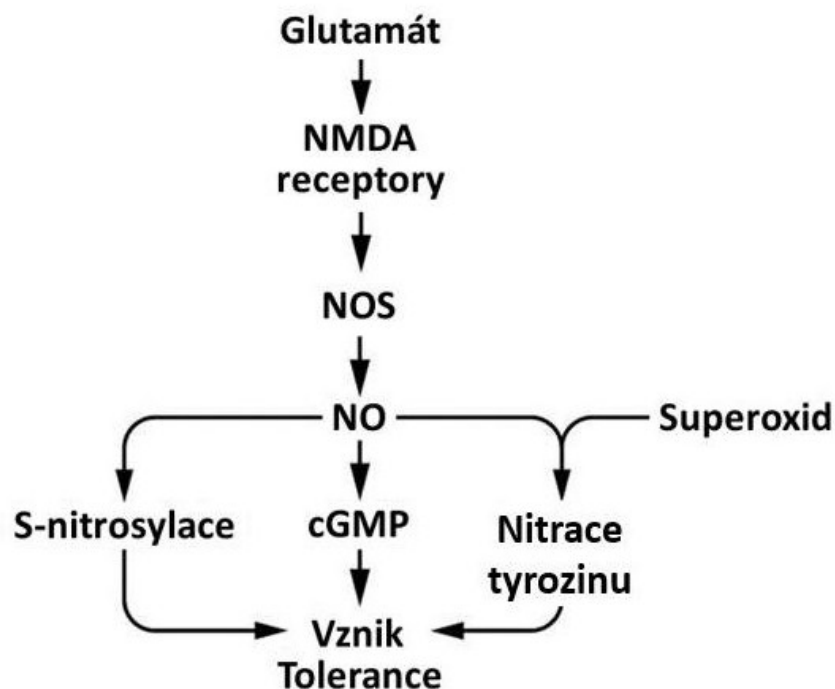
Novorozenci mají nízkou konjugační kapacitu, a proto je doba působení morfinu výrazně delší. Zároveň i malý stupeň útlumu dýchání, který morfin způsobuje, může být u novorozenců velkým rizikem. Z toho důvodu se podávání morfinu u novorozenců ani při porodu nedoporučuje (Rang *et al.*, 2003).

2.1.3. Vedlejší účinky

Po zavedení morfinu do lékařské praxe se brzy ukázalo, že kromě účinné analgezie vykazuje i poměrně velký potenciál pro vyvolání závislosti. Vzniklo tak velké úsilí pro vývoj bezpečnějších, efektivnějších a nenávykových opiátů. Jako zajímavost je možno uvést, že jedním z výsledků tohoto úsilí byl i heroin – derivát morfinu (poprvé syntetizovaný roku 1898), který byl následně propagován jako efektnější a především bezpečnější analgetikum nevyvolávající závislost (Brownstein, 1993).

Při dlouhodobém podávání morfinu často dochází k adaptivním změnám v odpovědi na jeho působení a dochází k rozvoji tolerance a v některých případech i závislosti. Tolerance se projevuje snížením citlivosti organismu k dané látce v důsledku jejího dlouhodobého nebo opakovaného podávání. Závislost lze definovat jako naprostou potřebu dané látky pro udržení normální fyziologické funkce organismu. Projevuje se fyzickou závislostí, která je spojena s abstinenčními příznaky a případně i psychickou závislostí, která je spojena s „touhou“ užít danou substanci (Taylor a Fleming, 2001).

Mechanismus vzniku tolerance není doposud zcela objasněn, ale jedná se pravděpodobně o komplexní proces modulací na úrovni receptorů (desenzitizace a internalizace), signálních transdukčních systémů (regulační proteiny vázající guaninové nukleotidy (G-proteiny), adenylylcykláza (AC), guanylylcykláza (GC) a regulační proteiny G-proteinové signalizace) a neurotransmiterů s jejich obvody. Důležitá se zdá být především signální kaskáda glutamát/N-methyl-D-aspartátový receptor (NMDAR) /oxid dusnatý (NO) (Pasternak, 2007), viz obr. 2.



Obr. 2: Schéma předpokládané signální kaskády glutamát/NMDAR/NO vedoucí ke vzniku tolerance (upraveno podle Pasternak, 2007). Po navázání glutamátu na NMDAR dochází k aktivaci NO-syntázy (NOS) a následné produkci NO, který okamžitě difunduje skrze membránu a podílí se na vzniku tolerance následujícími způsoby: A) Aktivuje GC vazbou na její hemovou skupinu, následně pak dochází k produkci druhého posla cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) B) S-nitrosyluje proteiny, například podjednotky NMDAR (Pasternak, 2007). C) Při setkání se superoxidem může být NO konvertován na peroxynitrit, který nitrací tyrozinových zbytků inaktivuje funkci proteinů (například glutamátový transportér GLT-1 a enzym glutaminsyntáza) zapojených do udržování homeostázy glutamátu a také mitochondriální Mn superoxiddismutázy (MnSOD), která svoji enzymatickou aktivitou katalyzuje dismutaci superoxidového radikálu (Muscoli *et al.*, 2007; Pasternak, 2007).

Závislost a zneužívání drog ovlivňuje mozkové okruhy spojené s odměnou (nucleus accumbens a ventrální palidum), motivací (orbitofrontální kortex a subkalózní oblast), pamětí a učením (amygdala a hipokampus) a kontrolou (prefrontální kortex a anteriorní cingulární gyrus) (Volkow *et al.*, 2003). Po akutním podání drogy se rychle uvolňuje dopamin a dochází tak k rychlé a výrazné aktivaci postsynaptických

dopaminergních receptorů. Rychlá aktivace těchto receptorů pravděpodobně způsobuje posilující efekt pro budoucí opakování stejného chování, tedy v tomto případě pro opětovné užití drogy. Dlouhodobé užívání drog ale vede naopak ke snížené aktivitě dopaminu. Tento hypodopaminergní stav může způsobit deregulaci mozkových obvodů spojených s odměnou a motivací, které se následně stávají méně citlivými pro přirozené posilující chování, jako je přijímání potravy nebo sexuální aktivita. Změny v dopaminergní signalizaci způsobují také dysfunkci orbitofrontálního kortexu, která u závislých jedinců vede k nutkavému užívání drog (Volkow *et al.*, 2002).

Opioidy se zdají být výborným řešením pro tlášení akutních bolestí, nicméně jejich volba pro dlouhodobé terapeutické užití není tak zřejmá. Při chronickém podávání opioidů musí být zvažén poměr benefitů a rizik (vedlejší efekty), které narůstají s prodlužující se délkou podávání a začínají postupně převažovat nad benefity. Více než jeden pacient ze čtyř se stává fyzicky a psychicky závislým již po několika týdnech užívání předepsané dávky opioidu. Následně pak může docházet k tomu, že závislí pacienti vyžadují opioidní léčbu spíše kvůli závislosti než bolesti samotné (Ling, 2017).

Vedle tolerance a závislosti jsou nejčastějšími vedlejšími účinky opioidů sedace, závratě, nevolnost, zvracení, zácpa a útlum dýchání (Benyamin *et al.*, 2008). Alespoň jeden vedlejší účinek během léčby opioidy zaznamenalo 96 % pacientů s chronickou bolestí a 92 % pacientů s akutní bolestí. Při výběru vhodného opioidu ze strany lékařů i pacientů hrají vedlejší účinky v 74 % případů důležitější roli než samotná schopnost daného opioidu tlumit bolest. Ve studii použité pro získání uvedených údajů bylo zahrnuto 618 pacientů a 325 lékařů a pro zajímavost je možné doplnit, že morfin byl k tlumení bolesti vybrán ve zhruba 10 % případů (Gregorian *et al.*, 2010).

Morfin patří mezi opioidy s relativně dlouhým působením a mezi jeho nejproblematictější nežádoucí vedlejší účinky patří zácpa a útlum dýchání. Akutní předávkování způsobuje kóma a útlum dýchání. (Rang *et al.*, 2003; Trescot *et al.*, 2008). Vedlejší účinky morfinu jsou způsobeny především:

1) Uvolňováním histaminu

Může způsobit bronchospazmus (zúžení průdušek), hypotenzi a kopřivku.

2) Snížením motility střev

Způsobuje zácpu.

3) Snížením sympatetického tonu

Má za následek snížení tonu v periferních žilách vedoucí k hromadění krve v žilním řečišti a ortostatické hypotenzi (Trescot *et al.*, 2008).

4) Přímým útlumem dýchání v mozgovém kmeni

Dochází ke snížené odpovědi dýchacích center na zvyšující se parciální tlak oxidu uhličitého v arteriích, reakční křivka oxidu uhličitého se posouvá doprava a snižuje se tak dechová frekvence. Vyvolaná respirační acidóza navíc zvyšuje přísun morfinu do mozku a tak se porucha dýchání prohlubuje.

5) Spasmem hladkého svalstva svěračů trávicího ústrojí a močových cest

Může docházet až ke žlučnickové kolice, opožděnému vyprazdňování žaludku a retenci moči.

6) Přímou stimulací dopaminergních receptorů v chemorecepční spouštěcí zóně ve čtvrté mozkové komoře

Způsobuje nevolnost a zvracení. Morfin ale naopak může tlumit centrum pro zvracení, které se nachází v prodloužené míše. Pokud je morfin podán intravenózně, dostává se do centra pro zvracení stejně rychle jako k chemoreceptorům a projevy nevolnosti jsou nižší (Stoelting a Miller, 2007; Trescot *et al.*, 2008).

7) Stimulací parasympatiku

Vyvolává bradykardii (zpomalení srdeční frekvence) a miózu (zúžení zornic). Mióza je důležitým diagnostickým prvkem, který značí předávkování (Rang *et al.*, 2003; Stoelting a Miller, 2007).

8) Imunosupresí

Především při chronickém působení, u citlivých jedinců nebo při náhlém přerušení podávání. Dochází k modulaci, která se odráží na změnách v biochemických a proliferačních vlastnostech různých buněčných složek imunitního systému (Stoelting a Miller, 2007).

Na rozdíl od jiných druhů analgetik mají opioidy dvě důležité vlastnosti – nezpůsobují poškození vnitřních orgánů a nemají horní mez pro dávkování (se zvyšující se dávkou opioidu narůstá i jeho účinnost a dochází k vyššímu stupni analgezie). Faktorem, který limituje dávku opioidu, není riziko poškození orgánů, ale rozvoj vedlejších účinků. Tolerance je všeobecně považována za negativní fenomén, protože

udržení stejného stupně analgezie vyžaduje postupné navyšování dávkování opioidů. Na toleranci však může být nahlíženo také jako na pozitivní efekt. Tolerance totiž nevzniká pouze na analgetický efekt, ale i na další vedlejší účinky, jako je sedace a především na útlum dýchání, který patří mezi nejobávanější komplikaci užívání opioidů. Pacientům s rozvinutou tolerancí tak může být podávána postupně se zvyšující dávka opioidu bez rizika útlumu dýchání a dalších vedlejších efektů s výjimkou zácpy (Thompson a Ray, 2003).

2.2. Endogenní opioidní peptidy

Při navázání na OR vykonávají opioidy svůj primární efekt napodobováním přirozeně se vyskytujících endogenních opioidních peptidů (EOP), které jsou vytvářeny v tělech živočichů včetně člověka. Systém EOP byl přitom objeven až v 70. letech 20. století, tedy v době, kdy už bylo dobře prostudováno antinociceptivní a návykové působení morfinu (Akil *et al.*, 1998). Mezi EOP jsou řazeny čtyři hlavní třídy: enkefaliny, endorfíny, dynorfíny a nociceptiny, které jsou vytvářeny z prekurzorů pro-enkefalinu, pro-opiomelanokortinu, pro-dynorfinu a pro-nociceptinu (Pugsley, 2002).

EOP můžeme nalézt především v centrálním a periferním nervovém systému, kde hrají důležitou roli v mechanismu supraspinální, spinální a periferní analgezie, v odměňujícím efektu po příjmu potravy a užití drog, v modulaci emocí a reakcí na stres (Benarroch, 2012). Obecně se EOP v těle zapojují do četných fyziologických regulací. Například během aktivace nervových vláken sympatiku se z nervových zakončení uvolňují spolu s agonistou β -AR noradrenalinem i enkefaliny (Wilson *et al.*, 1980). Dochází tak k funkčnímu propojení signálního systému opioidů a adrenergní signalizace. V srdečních myocytech toto propojení slouží jako důležitý regulační prvek β -AR signalizace, když enkefaliny skrze inhibici AC regulují metabolismus Ca^{2+} a s ním spojenou kontraktilitu srdce. Tato regulace může hrát významnou roli především při reakci myokardu na stresový podnět (Pepe *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1997). K produkci EOP ale nedochází pouze v neuronálních buňkách. Například enkefaliny se vytvářejí také přímo v kardiomyocytech (Springhorn a Claycomb, 1992). Endorfíny se pak uvolňují během zánětlivé reakce z buněk imunitního systému – granulocytů, monocytů a lymfocytů a pomáhají snižovat bolestivé stimuly vznikající v důsledku zánětu (Rittner *et al.*, 2001).

K EOP bývají řazeny i dva nedávno objevené peptidy endomorfín-1 a endomorfín-2 (Zadina *et al.*, 1997), doposud ale nebyl nalezen jejich gen ani endogenní prekurzor (Trigo *et al.*, 2010). U potkanů navozuje podání endomorfínu účinnou anestezii se sníženými vedlejšími účinky (Wilson *et al.*, 2000). Právě díky této vlastnosti se endomorfín brzy po svém objevení dostal do popředí vědeckého zájmu. Případnému klinickému využití ale bránila krátká doba účinku, nízká metabolická stabilita a relativně slabá schopnost prostupovat hematoencefalickou bariérou. Vědecké skupiny se proto v posledních letech zaměřily na vývoj stabilnějších analogů endomorfínu (Wang *et al.*, 2017), které jsou schopny navodit srovnatelnou míru analgezie jako morfin, avšak s nižšími vedlejšími účinky (Zadina *et al.*, 2016).

V tělech živočichů se nachází také takzvaný endogenní morfin, který má identickou strukturu jako morfin získaný extrakcí z *Papaver somniferum*. Poprvé byl izolován v roce 1985 z hovězího mozku (Goldstein *et al.*, 1985), ale dlouhou dobu panovaly spekulace o jeho endogenním původu. Až v roce 2010 byl předložen jasný důkaz endogenní syntézy morfinu z katabolitu dopaminu - tetrahydropapaverolinu (Grobe *et al.*, 2010). Endogenní morfin byl nalezen u bezobratlých i obratlovců včetně člověka. Lokalizován byl především v CNS, ale nalézt jej můžeme například i v plasmě, srdeční tkáni nebo bílých krvinkách (Stefano *et al.*, 2008).

2.3. Opioidní receptory

2.3.1. Typy opioidních receptorů

OR se obvykle dělí na tři typy: μ (mí, MOR), κ (kappa: KOR) a δ (delta, DOR), které se mezi sebou liší svou distribucí, specifickými ligandy a funkcí (Minami a Satoh, 1995). Přehled selektivity EOP a morfinu k jednotlivým OR je uveden v tabulce 1. Shrnutí hlavních farmakologických účinků, které jsou spojené s konkrétními OR, je uvedeno v tabulce 2.

Na základě strukturní a funkční homologie byl do skupiny OR později zařazen také ORL1 (opioid receptor-like 1) (Mollereau *et al.*, 1994), který je dnes podle svého EOP označován spíše jako receptor pro nociceptin/orphanin FQ opioidní peptid - NOR (Toll *et al.*, 2016).

Tabulka 1: Selektivita EOP a morfinu k MOR, DOR a KOR.

	MOR	DOR	KOR
β-Endorfin	+++	+++	+++
Leu-enkefalin	+	+++	-
Met-enkefalin	++	+++	-
Dynorfin	++	+	+++
Morfin	+++	+	+
K _i (nM)	0,26 – 8,6*	358*	52*

(+) ligand má afinitu k danému OR (počet „+“ odráží intenzitu); (-) neváže se na daný OR (upraveno podle Rang et al., 2003). Jak je z tabulky patrné, morfin má vysokou afinitu především k MOR, ale s nižší afinitou se dokáže navázat i na DOR a KOR. *Hodnoty K_i (zdánlivá disociační konstanta) byly získány kompetičními vazebnými studiemi a udávají afinitu morfinu k jednotlivým OR. Přitom platí, že se vzrůstajícím K_i se snižuje afinita k receptoru (Chen *et al.*, 1993).

Tabulka 2: Farmakologický efekt spojený s aktivací MOR, DOR a KOR.

	MOR	DOR	KOR
Analgezie:			
Supraspinální	+++	-	-
Spinální	++	++	+
Periferální	++	-	++
Útlum dýchání	+++	++	-
Mióza	++	-	+
Snížení motility GI*	++	++	+
Euforie	+++	-	-
Dysforie	-	-	+++
Sedace	++	-	++
Fyzická závislost	+++	-	+

(+) s účinkem (počet „+“ odráží intenzitu); (-) bez účinku (upraveno podle Rang et al., 2003).

*GI: gastrointestinální trakt

Tři hlavní skupiny OR bývají podle farmakologických studií dále rozdělovány na dva až tři receptorové podtypy: μ_1 - μ_3 (Cadet, 2004), κ_1 - κ_3 (Wollemann *et al.*, 1993) a δ_1 - δ_3 (Traynor a Elliott, 1993). Nicméně Dietis *et al.* (2011) status jednotlivých podtypů OR zpochybňuje a poukazuje na to, že by tato klasifikace měla být podložena důkazy na molekulární úrovni (tj. jeden podtyp OR musí být kódován jedním genem

a zároveň genový knockout daného podtypu musí způsobit kompletní ztrátu jeho funkce). V doposud provedených studiích ale vždy genový knockout jednoho z podtypů ztrácel všechny funkce spojené s celou skupinou OR. Z tohoto důvodu by mělo být nahlíženo na jednotlivé podtypy hlavních skupin OR spíše jako na výsledek a) alternativního sestřihu, b) dimerizace receptorů, c) interakcí s jinými signálními proteiny, d) usměrňovacího agonismu („biased agonism“, aktivace stejného receptoru různými ligandy může způsobit rozdílnou odpověď), popř. e) kombinace a – d (Dietis *et al.*, 2011). Molekulární techniky nicméně odhalily přes 30 sestřihových variant pro MOR u myši, 16 u potkanů a 19 u lidí. Některé z těchto sestřihových variant jsou přitom zkrácené a neodpovídají tak struktuře tradičních OR (Pasternak, 2014). Bez ohledu na existenci či neexistenci podtypů, by tak mělo být nahlíženo na OR jako na velmi komplexní skupinu.

2.3.2. Distribuce opioidních receptorů

Distribuce MOR, KOR a DOR je důkladně prozkoumána především v CNS, kde se s menšími regionálními rozdíly nacházejí všechny tři zmíněné skupiny (Mansour *et al.*, 1995), dále můžeme nalézt OR i v mnoha typech periferních tkáních. Detailní přehled distribuce MOR, KOR a DOR u potkana a člověka je uveden v tabulce 3.

V srdeční tkáni potkana byl pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR, polymerase chain reaction) původně detekován pouze DOR a KOR (Wittert *et al.*, 1996). Později byl ale MOR detekován pomocí imunofluorescenční mikroskopie v izolovaných potkaních kardiomyocytech (Head *et al.*, 2005). Tyto výsledky byly následně potvrzeny, když se opět podařilo detekovat MOR pomocí imunofluorescenční mikroskopie a kvantitativní PCR (qPCR) v tkáni získané z levé srdeční komory potkana (Treskatsch *et al.*, 2016).

Spekulace dlouho panovaly i kolem distribuce jednotlivých typů OR v lidském srdci. V biopsiích získaných ze srdečních síní a komor byly pomocí semikvantitativní PCR nejdříve s jistotou detekovány pouze DOR a MOR. KOR se vyskytoval v tak malém množství, že nebylo možno vyloučit kontaminaci neuronální tkání (Bell *et al.*, 2000). Pozdější qPCR analýza vzorků srdeční tkáně získaných z nekropsií prokázala přítomnost pouze KOR a DOR. Při srovnání s CNS, kde se ve většině analyzovaných oblastí

pohybovala exprese kolem 10^5 - 10^7 kopií/ μ g, byla v srdeční tkáni detekována poměrně nízká hladina exprese $3,8 \times 10^3$ kopií/ μ g u DOR a $6,3 \times 10^3$ kopií/ μ g u KOR (Peng *et al.*, 2012). V roce 2014 byla provedena studie využívající imunohistochemické značení srdeční tkáně získané z nekropsie. Tato studie jednoznačně prokázala výskyt MOR, DOR i KOR v lidském srdci. MOR a DOR byly přitom detekovány v kardiomyocytech i v individuálních nervových vláknech, KOR byl lokalizován především v kardiomyocytech (Sobanski *et al.*, 2014). Přítomnost MOR a DOR byla potvrzena také pomocí in vivo studie, která byla provedena na dobrovolnících pomocí pozitronové emisní tomografie (Villemagne *et al.*, 2002).

Lokalizace NOR je zdokumentována stejně jako u ostatních OR především v mozku, kde je vysoce exprimován například v oblastech spojených s bolestí, odměnou a drogovou závislostí (Toll *et al.*, 2016).

Tabulka 3: Přehled Expresí OR v periferních tkáních u potkana a člověka.

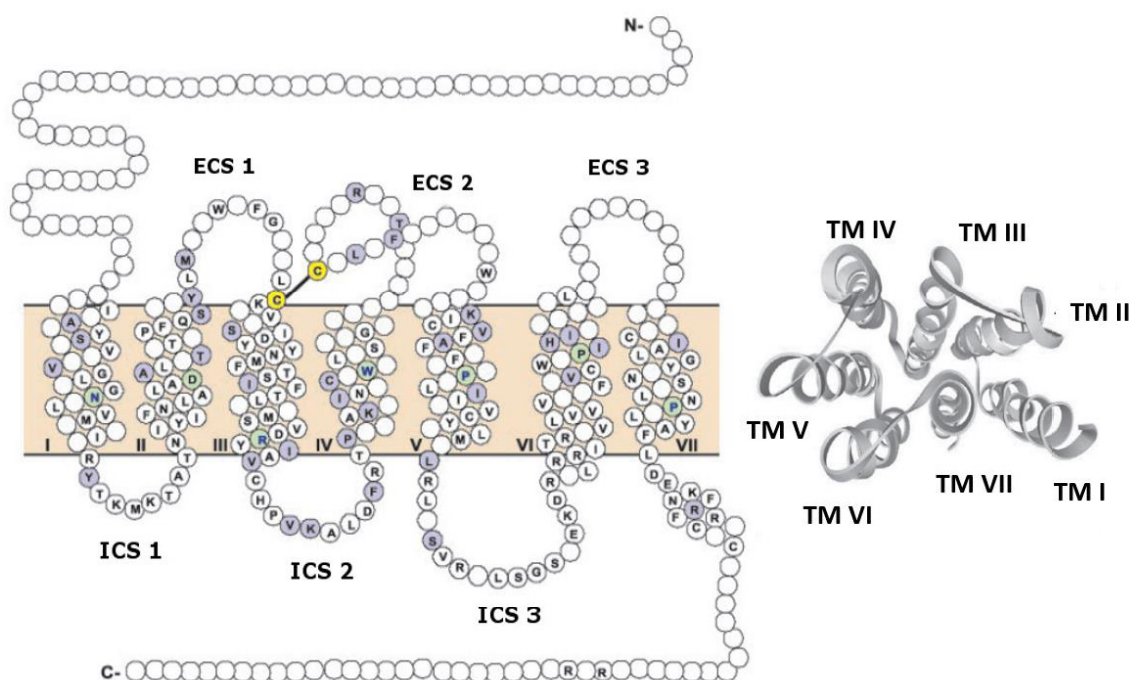
Typ tkáně	Potkan			Člověk		
	MOR	DOR	KOR	MOR	DOR	KOR
Srdce	+	+	+	+	+	+
Plíce	+	+	+	-	+	+
Játra	+	+	-	-	-	+
Žaludek	-	+	+			
Slinivka břišní				+	+	+
Tenké střevo	+	+	+	+	+	+
Tlusté střevo	+	+	+			
Ledviny	+	+	+	-	+	+
Nadledviny	+	+	+	+	+	+
Brzlík				-	+	+
Slezina	+	+	+	-	-	+
Varlata	+	+	+			
Vaječníky	+	+	+			
Děloha	+	+	+			
Endotel	-	-	-			
Synovium	-	-	-			
Kosterní svaly				-	+	+
Kožní fibroblasty					+	+

(+) exprimován; (-) nenalezen; (prázdný prostor) nestanoveno. Sestaveno podle: srdce potkan (Wittert *et al.*, 1996; Treskatsch *et al.*, 2016) a člověk (Sobanski *et al.*, 2014); ostatní tkáně potkan (Wittert *et al.*, 1996) a člověk (Salemi *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2012).

2.3.3. Opioidní receptory jakožto součást rodiny GPCR

OR patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR, G protein-coupled receptor). Zatímco ostatní členové rodiny GPCR nesdílejí s OR více než 30% homologii v aminokyselinové sekvenci, homologie mezi MOR, KOR a DOR dosahuje 65 - 70 % (Jordan a Devi, 1998). NOR je s ostatními OR identický ze 60 - 62 % (Meunier *et al.*, 2000). GPCR představují největší rodinu membránových receptorů s charakteristickou strukturou, která je tvořena sedmi transmembránovými α -helikálními segmenty (TM I – TM VII), třemi extracelulárními smyčkami (ECS1 – ECS3), třemi intracelulárními smyčkami (ICS1 – ICS3), extracelulárním N koncem a cytoplazmatickým C koncem. Na základě sekvenční a strukturní podobnosti se GPCR rozdělují do pěti tříd: rodopsinové (třída A), sekretinové (třída B), glutamátové (třída C), adhezní a „fizzled/taste2“. OR jsou členy rodopsinové třídy, která je největší a nejrozmanitější (Waldhoer *et al.*, 2004; Rosenbaum *et al.*, 2009). Aminokyselinové sekvence mezi jednotlivými typy OR jsou nejvíce konzervované v TM II, TM III, TM VII, ICS2 a ICS3, kde homologie přesahuje 70 %, naopak nejnižší homologii (< 10 %) nacházíme v ECS2 a ECS3 (Meunier *et al.*, 2000). Schematické znázornění struktury OR je uvedeno na obr. 3.

Extracelulární část receptoru vytváří kapsu, která může vázat ligandy s různou velikostí, tvarem a chemickými vlastnostmi. Vazba ligandu indukuje menší konformační změny v transmembránové části receptoru, které jsou přenášeny na intracelulární část, kde způsobují rozsáhlé strukturální přesmyky umožňující navázání a aktivaci heterotrimerního G-proteinu (Salazar *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2009; Venkatakrishnan *et al.*, 2013). Účinná energie přenášená mezi vazebným místem receptoru a místem interakce s G-proteinem, je závislá na četných interakcích mezi receptorem a jeho ligandem. Rozdílné ligandy tak mají různý efekt na strukturní vlastnosti receptoru a na jeho biologickou odpověď. Zatímco plný agonista vyvolává maximální stimulaci receptoru, částečný agonista není schopen maximální stimulace ani při své saturující koncentraci. Neutrální antagonist a nemá žádný efekt na aktivitu receptoru, ale může bránit navázání jiných ligandů. Inverzní agonista redukuje aktivitu receptoru pod bazální úroveň, kterou jsou některé GPCR schopny vykazovat i bez navázaného ligandu. Míra účinnosti ligandu přitom nemusí být úměrná jeho afinitě k receptoru a například částečný agonista může pro stejný receptor vykazovat vyšší afinitu než jeho plný agonista (Rosenbaum *et al.*, 2009).



Obr. 3: Struktura opioidního receptoru. **Vlevo:** ECS1 – ECS2: extracelulární smyčky; I – VII: transmembránové α -helikální segmenty; ICS1 – ICS3: intracelulární smyčky; prázdné bílé kroužky: nekonzervované aminokyselinové sekvence u MOR, DOR, KOR a NOR; bílé kroužky s písmenem: identické aminokyselinové sekvence mezi všemi čtyřmi typy OR; fialové kroužky: identické sekvence mezi MOR, KOR a DOR; zelené kroužky: vysoce konzervované sekvence rodopsinové třídy GPCR; žluté kroužky: dva cysteiny tvořící disulfidický můstek mezi TM III a ECS2*. **Vpravo:** Navrhované uspořádání sedmi transmembránových α -helixů OR při pohledu z vrchu - extracelulární strany (upraveno podle Waldhoer *et al.*, 2004). *Tento disulfidický můstek je vysoce konzervovaný a můžeme ho nalézt u většiny GPCR. Nachází se v blízkosti vazebného místa a slouží jako kotva, která pomáhá stabilizovat receptor během jeho aktivace ligandem (Venkatakrishnan *et al.*, 2013).

2.3.4. Efektory opioidních receptorů

OR přednostně váží pertusis toxin senzitivní G_o a G_i proteiny (Connor a Christie, 1999). V inaktivním stavu se G-proteiny skládají z G_α podjednotky s navázaným guanosindifosfát (GDP) a $G_{\beta\gamma}$ dimeru. Vazba ligandu na OR indukuje výměnu GDP za guanosintrifosfát (GTP), tím dochází k aktivaci a následné disociaci G_α podjednotky od

receptoru a $G_{\beta\gamma}$ dimeru (Hamm a Gilchrist, 1996). Aktivované podjednotky G_α a $G_{\beta\gamma}$ pak dále šíří signál uvnitř buňky prostřednictvím dále popsaných efektorů.

2.3.4.1. Adenylycykláza (AC)

V rodině savčích AC bylo doposud identifikováno 9 genů kódujících membránově vázané izoformy (AC I – IX) a jeden gen kódující solubilní izoformu (AC X). Všechny membránově vázané izoformy jsou stimulované G_{α_s} proteiny a můžeme je nalézt především ve vzrušivých tkáních - nervové a svalové. (Sunahara a Taussig, 2002).

$G_{\alpha_{i/o}}$ podjednotka inhibuje pouze tři izoformy: AC I, V a VI (Sunahara *et al.*, 1996; Sunahara a Taussig, 2002). Aktivita AC ale může být ovlivněna také podjednotkou $G_{\beta\gamma}$, která stimuluje AC II, IV a VII a inhibuje AC I, V, VI, a VIII (Bian *et al.*, 2012).

V srdeční tkáni savců byly lokalizovány čtyři izoformy AC (IV-VII), přičemž za dominantní izoformy jsou považovány AC V a AC VI (Iyengar, 1993; Espinasse *et al.*, 1995).

Důležitou roli v modulaci aktivity AC hraje také délka aktivace OR. Zatímco akutní působení opioidů je spojeno především s inhibicí AC, dlouhodobá aktivace OR může vést naopak k upregulaci AC. Tento fenomén se nazývá heterologní senzibilizace AC. V závislosti na tom, jestli dochází při dlouhodobé aktivaci OR ke zvýšení nebo snížení stimulované aktivity AC, je tento jev označován také jako superaktivace nebo superinhibice. Konkrétní efekt heterologní senzibilizace je specifický pro jednotlivé izoformy AC. Jak již bylo popsáno výše, akutní působení podjednotek $G_{\alpha_{i/o}}$ a $G_{\beta\gamma}$ vede k inhibici AC I, V, VI a VIII a stimulaci AC II, IV a VII. Dlouhodobá aktivace OR pak naopak způsobuje superaktivaci AC I, V, VI a VIII a superinhibici AC II, IV a VII. (Schallmach *et al.*, 2006).

Při akutním působení opioidů tedy dochází k inhibici AC a následnému snížení hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v buňce. Hladina cAMP moduluje aktivitu hyperpolarizací-aktivovaných kationtových kanálů (I_h), které zajišťují neselektivní tok kationtů do buňky během hyperpolarizace, čímž napomáhají depolarizovat buňku směrem k prahu pro vznik akčního potenciálu. Pokud je hladina cAMP zvýšená, kanály se aktivují dříve (během méně negativního membránového

potenciálu). Snížením hladiny cAMP, posouvají opioidy aktivaci těchto kanálů do zápornějších hodnot membránového potenciálu a tak snižují excitabilitu buňky. Dalším důsledkem inhibice AC je snížení aktivity cAMP-dependentní proteinkinázy A (PKA), čímž může docházet k poklesu na PKA závislém uvolňování neurotransmiterů (Williams *et al.*, 2001). Důležitou rolí cAMP-dependentní PKA je také fosforylace transkripčního faktoru CREB (cAMP response element-binding protein - protein vázající cAMP responzivní element), který se následně váže jako dimer na cAMP responzivní element (CRE, cAMP response element) v jádře a za přítomnosti specifických koaktivátorů indukuje expresi vybraných (cAMP responzivních) genů. Mezi ně patří například geny kódující proteiny, které jsou zapojené do metabolismu, signalizace, buněčného cyklu a transkripce, ale také neuropeptidy, neurotransmitery a růstové faktory (Mayr a Montminy, 2001).

2.3.4.2. Fosfolipáza C β (PLC β)

PLC β je aktivována podjednotkou G $\beta\gamma$ (Murthy a Makhoul, 1996). Činností PLC β poté dochází ke štěpení fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) na diacylglycerol (DAG) a inositol 1,4,5-trifosfát (IP₃). Uvolněný IP₃ poté mobilizuje z vnitrobuněčných zásobáren Ca²⁺, který společně s DAG aktivuje proteinkinázu C - PKC (Barry a Zuo, 2005).

Rodina PKC obsahuje minimálně 12 izoenzymů, které se na základě struktury a závislosti na konkrétních druhých poslech rozdělují do tří skupin: 1) konvenční (izoenzymy α , β I, β II a γ), jejich aktivace je závislá na Ca²⁺, fosfatidylserinu (PS) a DAG; 2) nové (izoenzymy δ , ϵ , η , a θ), nezávislé na Ca²⁺, k aktivaci vyžadují PS a DAG; 3) atypické (izoenzymy ζ a ι/λ), nezávislé na Ca²⁺ a DAG, k aktivaci vyžadují PS (shrnutí v publikaci Way *et al.*, 2000). PKC mají široké spektrum fosforylačních substrátů (například iontové kanály, receptory, scaffold proteiny a proteinkinázy), jejichž regulací dochází k ovlivnění četných fyziologických funkcí jako je diferenciace, proliferace, migrace a apoptóza (Bian *et al.*, 2012).

Několik studií navíc prokázalo, že aktivace OR s následnou mobilizací PKC může pozitivně regulovat činnost AC. Rubovitch *et al.*, (2003) ve své práci popisuje, že PKC může pravděpodobně indukovat otevírání vápníkových kanálů v plazmatické membráně. Tím dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺ a následné aktivaci Ca²⁺

senzitivních izoforem AC. Chakrabarti *et al.*, (2005) uvádí, že při podávání morfinu dochází působením PKC- γ k fosforylaci G-proteinové podjednotky G_{β} . Tato fosforylace poté zvyšuje schopnost podjednotky $G_{\beta\gamma}$ stimulovat aktivitu AC II.

Opioidy také přímo modulují elektrofyziologické události přenášené iontovým kanálem NMDAR v CNS (Mao, 1999). Po podání morfinu je signál z OR na NMDAR přenášen pomocí PKC (Chen a Huang, 1991). PKC pak svojí fosforylační aktivitou zvyšuje pravděpodobnost otevření iontového kanálu NMDAR tím, že snižuje blokující interakci mezi Mg^{2+} a pórem kanálu. (Chen a Huang, 1992). Při chronickém podávání morfinu dochází působením PKC k hyperaktivaci NMDAR na presynaptické membráně primárních nociceptivních aferentních neuronů v míše. Hyperaktivace NMDAR způsobuje zvýšený výlev glutamátu do synaptické štěrbiny, čímž dochází k zesílení nociceptivního signálu, který je předáván na postsynaptickou membránu neuronů v zadních rožích míšních. Hyperaktivace NMDAR, se tak významně podílí na rozvoji hyperalgie a opioidní tolerance (Zhao *et al.*, 2012).

2.3.4.3. Iontové kanály

Regulaci iontových kanálů zajišťuje s velkou pravděpodobností podjednotka $G_{\beta\gamma}$ přímými protein-proteinovými interakcemi (Jan a Jan, 1997). Působením opioidů dochází k aktivaci K^+ kanálů a inhibici Ca^{2+} kanálů v cytoplazmatické membráně (North, 1986; Standifer a Pasternak, 1997; Williams *et al.*, 2001). Excitabilita buňky se tím snižuje a v závislosti na místě působení dochází ke snížení výlevu excitačních (acetylcholin a glutamát) či inhibičních (kyselina γ -aminomáselná – GABA a glycin) neurotransmiterů (North, 1986; Williams *et al.*, 2001). Snížení excitability buňky je základním principem antinociceptivního působení morfinu. Některé studie přitom připisují hlavní roli v navození antinocicepce především Ca^{2+} kanálům (Smith a Stevens, 1995; Wang *et al.*, 2000), jiné ale poukazují i na důležitost K^+ kanálů (Ocaña *et al.*, 1995, 2004).

2.3.4.4. Fostatidylinositol-3-kináza (PI3K)

Podjednotka $G_{\beta\gamma}$ stimuluje také aktivitu lipidových kináz PI3K β a PI3K γ (Maier *et al.*, 1999). Aktivovaná PI3K fosforyluje PIP2 v membráně za vzniku druhého posla

fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu (PIP3). K PIP3 se následně svojí pleckstrin-homology doménou váže Akt kináza (někdy také označována jako proteinkináza B - PKB), tím je indukována její konformační změna a dochází k odhalení dvou klíčových aminokyselin, jejichž fosforylace je nezbytná pro plnou aktivaci kinázy. Tuto fosforylaci zajišťují fosfoinositid dependentní kináza 1 (PDK1), PDK2 a pravděpodobně i některé další kinázy (shrnutí v publikaci Hennessy *et al.*, 2005).

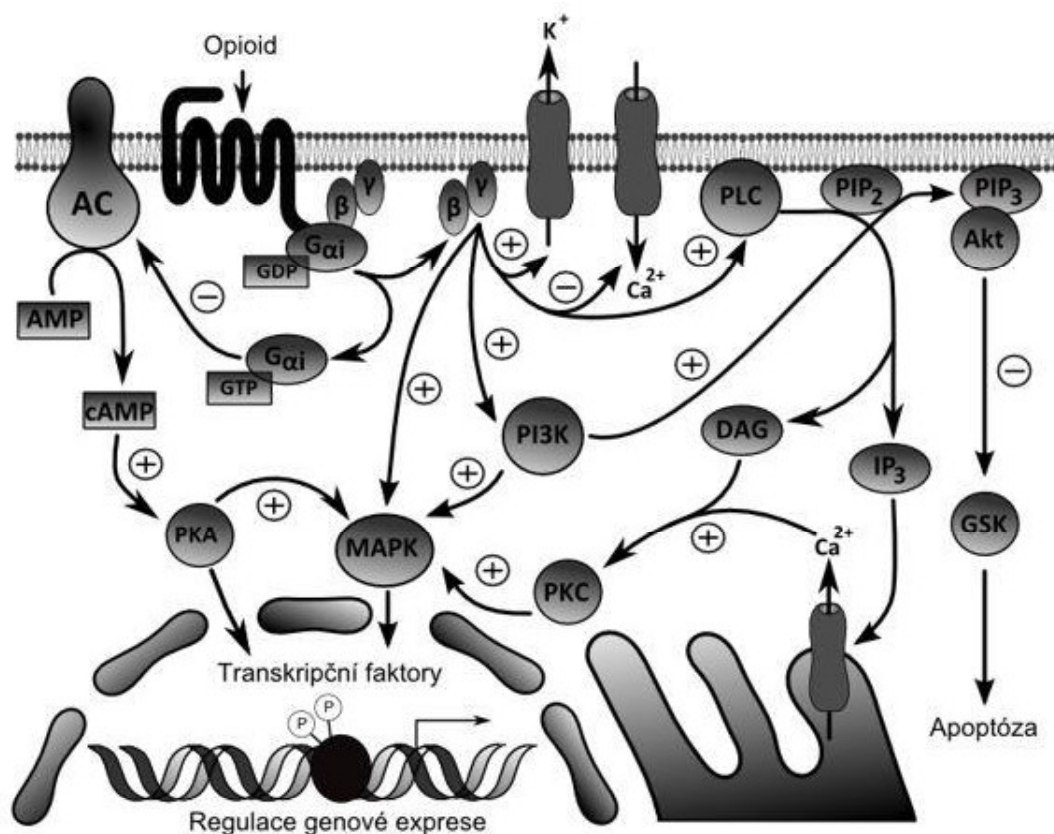
Významnou funkcí Akt je inhibiční fosforylace proapoptotického proteinu Bad (Datta *et al.*, 1997) a glykogen syntázy kinázy-3 β (GSK-3 β), která je zapojena do četných buněčných procesů jako je metabolismus, proliferace a diferenciací. GSK-3 β má ale také důležitou roli v regulaci apoptózy (Pap a Cooper, 1998; Olanas *et al.*, 2011), když svojí činností ovlivňuje expresi a aktivitu molekul zapojených do vnitřní signální dráhy apoptózy. Tato signální dráha může být spuštěna na základě podnětů, které poškozují buňku (například oxidativní stres nebo poškození deoxyribonukleové kyseliny - DNA). Zvýšená aktivita GSK-3 β má za následek snížení prahu pro aktivaci vnitřní signální dráhy apoptózy, jejíž spuštění vede k narušení funkce mitochondrií a následné programované buněčné smrti (Beurel a Jope, 2006). PI3K/Akt signální dráha inhibující aktivitu GSK-3 β je proto označována jako dráha buněčného přežití (Pap a Cooper, 1998).

2.3.4.5. Mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK)

MAPK tvoří rodinu serin/threoninových kináz, které jsou charakteristické třístupňovou aktivační fosforylační kaskádou. MAPK řídí rozmanité buněčné procesy zahrnující embryogenesi, diferenciaci, buněčnou proliferaci, genovou expresi a apoptózu. Jejich aktivita může být indukována širokým spektrem podnětů, které přicházejí z buňky i jejího okolí. Mezi nejčastěji popisované MAPK patří: kinázy regulované extracelulárním signálem (ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases), c-Jun N-terminální kinázy (JNK 1-3) a p38 (α , β , γ , a δ) (Raman *et al.*, 2007) viz obr. 6.

OR mohou aktivovat MAPK dráhy signálními mechanismy, které jsou závislé nebo nezávislé na G-proteinech (Law, 2011). Signální mechanismy nezávislé na G-proteinech souvisí s desenzitizací a internalizací OR a větší pozornost jim bude věnována v následující kapitole 2.3.5. Desenzitizace a internalizace.

Na aktivaci MAPK drah signálními mechanismy závislými na G-proteinech se mohou podílet $G_{\beta\gamma}$ podjednotka (Belcheva *et al.*, 1998), PKC (Belcheva *et al.*, 2005; Rozenfeld a Devi, 2007), PI3K (Kam *et al.*, 2004), PI3K/Akt (Shahabi *et al.*, 2006) a PKA (Zhang *et al.*, 1999). Signální dráhy vedoucí od OR k MAPK nelze přitom zcela jednoduše popsat, protože vždy závisí na konkrétním ligandu, OR a kontextu prostředí, ve kterém se buňka nachází.



Obr. 4: Schéma základních signálních drah G_0/G_i proteinů po aktivaci OR.

2.3.5. Desenzitizace a internalizace

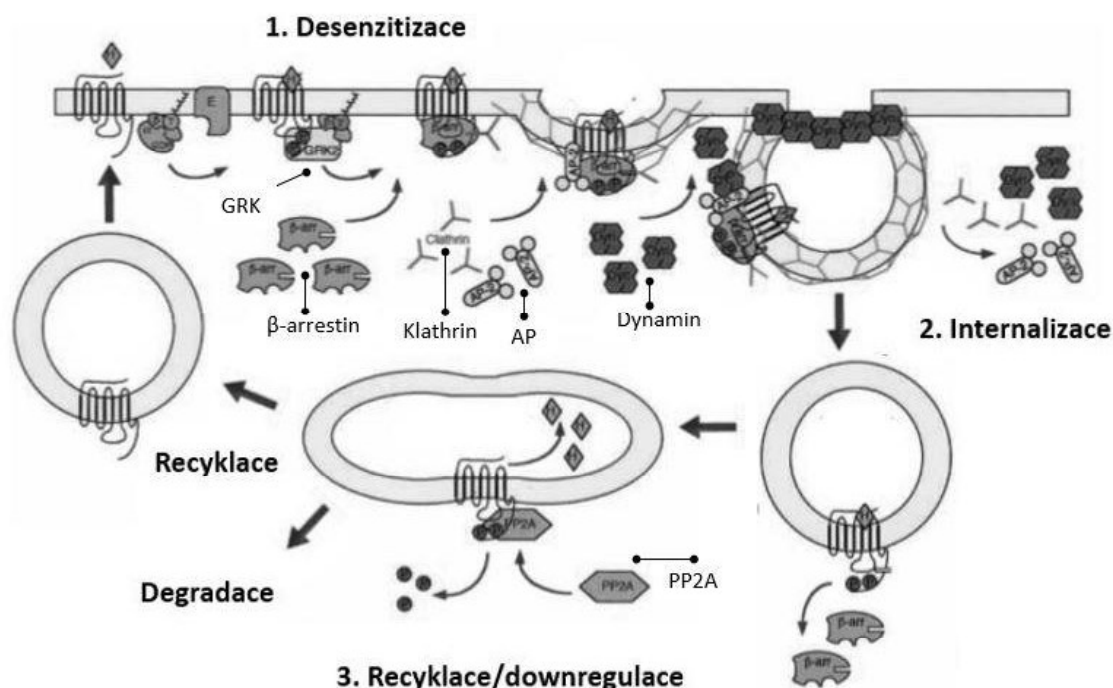
Desenzitizace receptoru je zahájena již několik sekund po expozici ligandem. Podílí se na ní kinázy aktivované druhými posly, jako jsou PKA a PKC, které fosforylují serinové a threoninové zbytky ICS a cytoplazmatického C konce receptoru (Luttrell a Lefkowitz, 2002). Fosforylace intracelulárních částí indukují změnu konformace, která znemožňuje receptoru dále vázat a aktivovat G-proteiny. Tato desenzitizace se označuje jako heterologní, protože jakýkoli ligand, který dokáže aktivovat PKA či PKC může

desenzitizovat jakýkoli GPCR s příslušnými fosforylačními místy (Lefkowitz, 1998), tedy i receptor bez navázaného ligandu (Luttrell a Lefkowitz, 2002).

Hlavním buněčným mechanismem deaktivace receptoru je ale rychlá homologní desenzitizace, kterou zprostředkovávají G-protein vázající receptorové kinázy (GRK, G protein-coupled receptor kinases) a β -arrestin. GRK se vážou na $G_{\beta\gamma}$ podjednotku a fosforylují serinové a threoninové zbytky na ICS3 a cytoplazmatickém C konci aktivovaného receptoru. Samotná fosforylace nemá velký vliv na aktivitu receptoru, ale zvyšuje afinitu k β -arrestinu, jehož navázání brání aktivaci dalšího G-proteinu. β -arrestin navíc slouží jako adaptorový protein, který umožňuje navázání klathrinu a dalších komponent podílejících se na internalizaci receptoru pomocí endozomálního váčku. Po internalizaci může být receptor recyklován zpět do membrány nebo naveden do lyzozomů, kde je degradován (Lefkowitz, 1998; Luttrell a Lefkowitz, 2002; Gurevich a Gurevich, 2006) viz obr. 5.

Proces internalizace receptoru je přitom významně ovlivněn navázáním konkrétního ligandu. Zatímco enkefalin i etropin indukují rychlou internalizaci DOR a KOR, podání morfinu nevyvolává internalizaci ani jednoho z uvedených OR (Keith *et al.*, 1996). Jedna ze studií to vysvětluje tím, že morfin jakožto částečný agonista OR indukuje jen takovou konformační změnu, která v porovnání s plným agonistou, umožňuje pouze dílčí fosforylaci cytoplazmatického C konce. Tato fosforylace je přitom dostatečná pro desenzitizaci receptoru, ale nestačí pro zahájení endocytózy (Schulz *et al.*, 2004). Jelikož morfin selhává v indukci internalizace receptoru, dalo by se předpokládat, že při desenzitizaci OR nedochází k interakci receptoru s β -arrestinem. Působení morfinu u myší s vyřazeným genem pro β -arrestin (β -arrestin-knockout), ale vykazuje významně zesílený a déletrvající analgetický efekt (Bohn *et al.*, 1999). Zároveň ani při chronickém podávání morfinu nedochází u β -arrestin-knockout myší k rozvoji antinociceptivní tolerance. To dokazuje, že se β -arrestin podílí na desenzitizaci OR také po podání morfinu. Delece β -arrestinu nicméně nezabraňuje rozvoji závislosti (Bohn *et al.*, 2000). Pozdější výzkum ukázal, že morfinem aktivované MOR jsou následně fosforylovány působením GRK5, zatímco MOR aktivované plným agonistou jsou fosforylovány GRK2/3. Činnost GRK5 sice ve srovnání s GRK2/3 indukuje menší míru fosforylace receptoru, nicméně i ta je stále dostatečná pro navázání β -arrestinu. Autor článku přitom

předpokládá, že komplex MOR- β -arrestin vzniká, ale pravděpodobně není dostatečně stabilní pro zahájení endocytózy (Doll *et al.*, 2012).

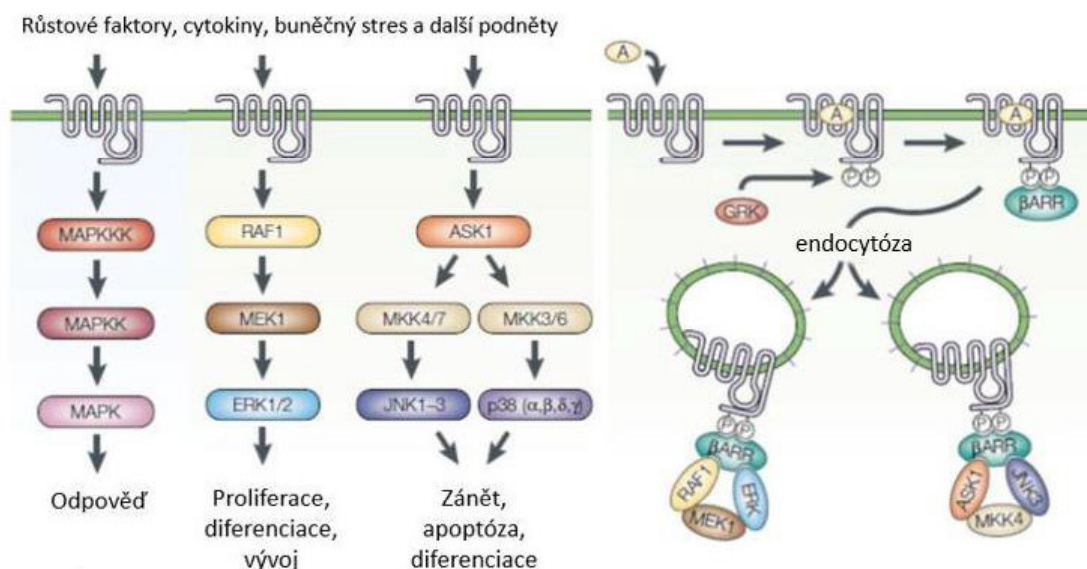


Obr. 5: Role β -arrestinu v homologní desenzitizaci a internalizaci GPCR. 1. Desenzitizace: Receptor aktivovaný ligandem (H) je fosforylován pomocí GRK, dochází k navázání β -arrestinu, který dále umožňuje navázání komponent podílejících se na tvorbě klathrinem opláštěného váčku (klathrin, adaptorové proteiny (AP) a dynamin). 2. Internalizace: Po internalizaci dochází k rozpadnutí opláštění váčku a uvolnění vazby mezi receptorem a β -arrestinem. 3. Recyklace/downregulace: V kyselém prostředí endozomu dochází k disociaci ligandu, receptor je defosforylován pomocí GPCR-specifických protein serin/threonin fosfatáz (PP2A) a následně degradován (downregulován) nebo recyklován zpět na membránu (upraveno podle Luttrell a Lefkowitz, 2002).

Cyklus desenzitizace – internalizace – recyklace x degradace je rychlý a dynamický proces, kterým buňka může usměrňovat signál přicházející přes receptory. Zatímco EOP indukují rychlou desenzitizaci receptoru, internalizaci i recyklaci, absence internalizace po aktivaci morfinem zpomaluje zpětnou recyklaci receptoru na membránu.

Zároveň morfin indukuje jen slabou desenzitizaci receptoru, což může vést k buněčným adaptacím v signalizační kaskádě G-proteinů. Absence internalizace a nedostatečná desenzitizace receptoru se tak s velkou pravděpodobností zásadně podílí na rozvoji tolerance a závislosti při chronickém podávání morfinu (Martini a Whistler, 2007).

β -arrestin hraje důležitou roli také v buněčné signalizaci, když po navázání na aktivovaný receptor slouží jako scaffold protein, který spojuje sekvenci kináz v MAPK kaskádě. β -arrestin tak usnadňuje vytváření protein-proteinových interakcí, zajišťuje specifitu signálu a udržuje správnou distribuci jednotlivých komponent MAPK kaskády (Pierce a Lefkowitz, 2001; Reiter a Lefkowitz, 2006) viz obr. 6.



Obr. 6: Aktivace MAPK signální dráhy pomocí GPCR a β -arrestinu. **Vlevo:** Po aktivaci GPCR dochází k postupné kaskádovité fosforylaci a aktivaci: kinázy kináz MAPK (MAPKKK), kinázy MAPK (MAPKK) a MAPK. Dále jsou znázorněny tři nejznámější MAPK – ERK, JNK a p38 spolu s jejich příslušnými MAPKK (MEK1, MKK4/7 a MKK 3/6) a MAPKKK (RAF1 a ASK1). **Vpravo:** β -arrestin jako scaffold protein umožňující navázání jednotlivých kináz MAPK kaskády a jejich následnou aktivaci (upraveno podle Pierce a Lefkowitz, 2001).

MAPK kaskády, které jsou aktivované působením G-proteinů, jsou zpravidla translokovány do jádra, kde následně fosforylují své substráty. U β -arrestinem

stimulovaných MAPK kaskád k translokaci do jádra nedochází a tak mohou fosforylovat pouze cytosolické substráty (DeFea *et al.*, 2000).

Další role komplexu receptor- β -arrestin je aktivace Src tyrozinkinázy. Tato kináza se uplatňuje například v aktivaci ERK MAPK kaskády (Luttrell *et al.*, 1999) a fosforylaci dynaminu, která je nezbytná pro zahájení endocytózy receptoru (Miller *et al.*, 2000).

2.4. Toll-like receptory (TLR)

TLR jsou součástí systému nespecifické imunity. Jejich funkcí je především identifikace specifických molekulárních vzorů mikrobiálních produktů, čímž pomáhají rozpoznávat přítomnost patogenních mikroorganismů. Savčí rodinu TLR tvoří 11 členů, kteří jsou stimulováni různými ligandy exogenního i endogenního původu. Mezi exogenní ligandy patří například lipopolysacharid (LPS) pocházející z buněčné stěny gram negativních bakterií nebo dvouvláknová virová ribonukleová kyselina (RNA). Endogenní ligandy často vznikají při poškození tkáně a zahrnují například heat shock proteiny (HSP, proteiny tepelného šoku) a fibronektin. Stimulace TLR indukuje aktivaci MAPK drah a transkripčního faktoru NF- κ B (nukleární faktor kappa B), který se poté přemisťuje do jádra a indukuje expresi cílových genů. V důsledku působení NF- κ B poté dochází k aktivaci komponent nespecifické imunity i antigenů specifické imunity (Akira a Takeda, 2004).

Nedávná studie ukazuje, že morfin přímo aktivuje TLR4 a indukuje tak uvolnění prozánětlivých látek jako jsou cytokiny. Morfin se podobně jako LPS váže na myeloidní diferenciací protein 2 (MD-2), čímž indukuje oligomerizaci TLR4/MD-2, která spouští aktivaci TLR4. Zajímavým zjištěním stejné studie navíc je, že narušení vazby mezi TLR4/MD-2 zvyšuje analgetický efekt morfinu *in vivo* (Wang *et al.*, 2012). Aktivaci TLR v CNS je přitom připisován významný podíl na vzniku nežádoucích účinků (tolerance, závislost a odměňující efekt), které jsou spojené s podáváním opioidů (Hutchinson *et al.*, 2007). Pozdější *in vivo* experimenty ale úlohu TLR4 v morfinem navozené toleranci, hyperalgezií ani fyzické závislosti nepotvrdily (Fukagawa *et al.*, 2013; Mattioli *et al.*, 2014).

TLR4 může být aktivován také metabolitem morfinu M3G, který vyvolává dokonce vyšší aktivitu receptoru než samotný morfin. Při srovnání s LPS ale morfin i M3G indukují jen slabou aktivitu TLR4. Pravděpodobně tak díky kompetici o vazebné místo může podání morfinu i M3G (v závislosti na jejich dávce), signifikantně snížit aktivitu TLR4 vyvolanou LPS (Xie *et al.*, 2017). Zatímco v CNS se morfin podílí na zvýšení prozánětlivé reakce, na periférii naopak působí imunosupresivně, když skrze aktivaci MOR snižuje messenger RNA i hladinu proteinu TLR4 v peritoneálních myších makrofázích (Franchi *et al.*, 2012).

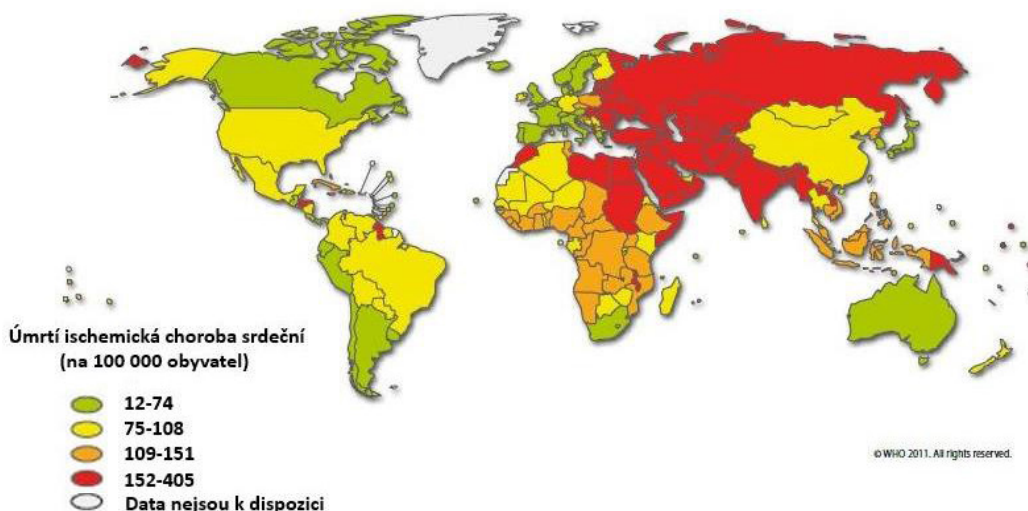
Systém nespecifické imunity včetně TLR2 a TLR4 je úzce zapojen také do patogeneze kardiovaskulárních chorob - aterosklerózy, akutního koronárního syndromu, virové myokarditidy, sepse, I-R poškození a srdečního selhání. Krátkodobá aktivace nespecifické imunity je prospěšná a může upregulovat cytotoprotektivní mechanismy a usnadnit obnovu tkáně. Po dlouhodobé nebo příliš intenzivní aktivaci TLR ale může naopak docházet k vyvolání neúměrné protizánětlivé reakce, která vede k nadměrnému a nežádoucímu poškození tkáně (Mann, 2011).

Podání nízké dávky endotoxinu nebo LPS před ischemií snižuje I-R poškození srdce (Brown *et al.*, 1989; Meng *et al.*, 1997). Zároveň TLR4 knockout myši vykazují nižší míru nepříznivé remodelace levé srdeční komory po infarktu myokardu (Timmers *et al.*, 2008) a inhibice TLR4 může snižovat I-R poškození srdce (Shimamoto *et al.*, 2006). Jak je tedy patrné, aktivace TLR může hrát současně významnou roli v kardioprotekci i v nepříznivém poškození srdeční tkáně.

Doposud nebyla vypracována studie, která by se zabývala vlivem morfinu na TLR4 ve vztahu protektivního působení na srdeční tkáň. Hypoteticky by ale podání morfinu před ischemií mohlo vyvolat protektivní aktivaci TLR a zároveň by mohlo skrze aktivaci MOR downregulovat dlouhodobé působení TLR, které přináší škodlivé následky. Do hry se navíc teoreticky dostává i hlavní metabolit morfinu M3G, který by se mohl spolupodílet na kardioprotektivním působení.

2.5. Ischemicko-reperfuční poškození myokardu

Kardiovaskulární onemocnění jsou v současné době celosvětově nejčastější příčinou úmrtí. Odhaduje se, že v roce 2015 zemřelo na jejich následky 17,7 milionů lidí, což představuje 31 % všech úmrtí na celém světě. Ze 75 % dochází k úmrtím na kardiovaskulární onemocnění v zemích s nízkými a středními příjmy. Jejich rozvoji lze přitom ve většině případů zabránit omezením rizikových faktorů chování jako je užívání tabáku, nezdravá strava, obezita, nízká fyzická aktivita a nadměrné užívání alkoholu. Z celkového počtu úmrtí všech kardiovaskulárních chorob si téměř 42 % (7,4 miliónu) vyžádaly ischemické choroby srdeční - ICHS (World Health Organization, 2017) viz obr. 7. V České Republice bylo za rok 2015 hospitalizováno s ICHS (infarkt myokardu a ostatními ischemické onemocnění) 57 097 pacientů. Tyto nemoci si vyžádaly celkem 23 748 úmrtí, což tvoří více než 21 % všech úmrtí za rok 2015 (Ústav zdravotnických informací a statistiky (Česká Republika), 2016).



Obr. 7: Věkově standardizovaná úmrtnost v důsledku ischemických chorob srdečních (na 100 000 obyvatel, obě pohlaví) pro rok 2008 (upraveno podle Mendis *et al.*, 2011).

Ischemická choroba srdeční se rozvíjí v důsledku mnoha etiologických rizikových faktorů a vždy se vyskytuje s jinými chorobnými stavy jako je hypertenze, hypertrofie levé srdeční komory, hyperlipidémie, ateroskleróza, diabetes, inzulinová rezistence,

srdeční selhání a stárnutí. K ischemii dochází při omezení průtoku krve v koronárních cévách, v důsledku čehož dochází k nedostatečnému zásobení srdeční tkáně kyslíkem a živinami. Pro maximální záchranu tkáně je nejdůležitější včasné obnovení průtoku krve – reperfuze (Ferdinandy *et al.*, 2007). Nicméně i obnovení průtoku krve může vést k dalším komplikacím, k takzvanému reperfuznímu poškození, které může být spojené s poruchou kontraktility (označováno jako „stunning“ - omráčení myokardu), arytmiemi a letálním poškozením kardiomyocytů (Piper *et al.*, 1998).

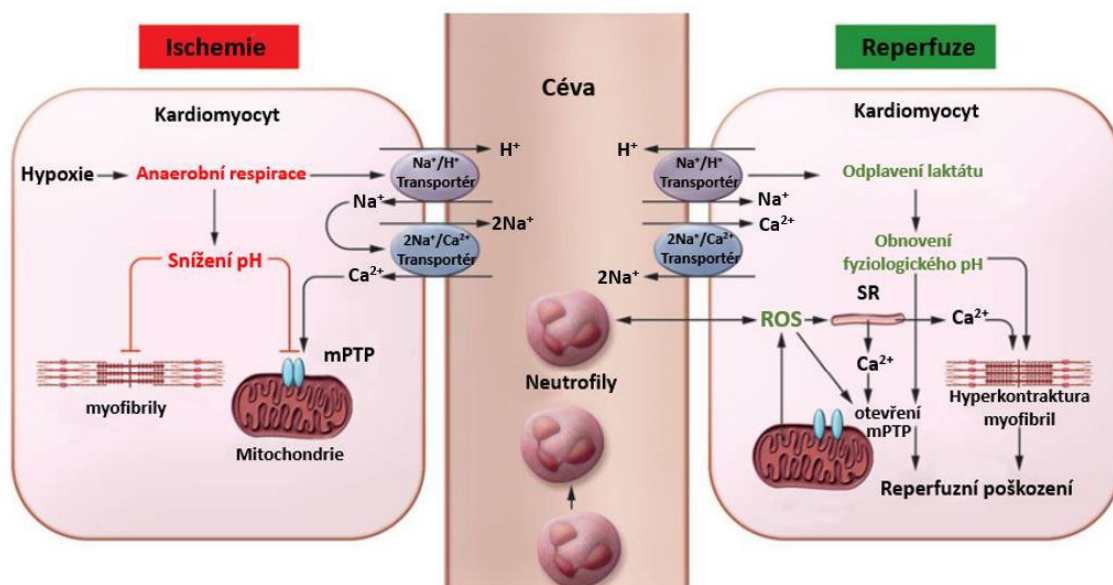
Během akutního infarktu se v důsledku nedostatku kyslíku přepíná buněčný metabolismus na anaerobní respiraci, dochází k produkci laktátu a snížení intracelulárního pH. Tím se aktivuje Na^+/H^+ transportér, který začne přenášet H^+ ven z buňky a Na^+ do buňky. Zvýšená koncentrace Na^+ v cytosolu indukuje aktivaci $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transportéru, který začne přenášet ionty v opačném směru než obvykle, čímž dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . V důsledku nedostatku adenosintrifosfátu (ATP) přestává fungovat Na^+/K^+ -ATPáza a vzrůstá koncentrace Na^+ v cytosolu, zároveň ze stejného důvodu ztrácí sarkoplazmatické retikulum (SR) schopnost vstřebávat Ca^{2+} . Zvyšující se intracelulární koncentrace (buněčné přetížení) Ca^{2+} a Na^+ vytváří hypertonické prostředí a do buňky proniká voda. Buňka začíná bobtnat, což může vést až k narušení struktury SR. Vysoká koncentrace Ca^{2+} navíc aktivuje proteázy a fosfatázy, které dále poškozují SR. Pokud nedojde k obnovení průtoku krve dostatečně brzy, SR praská a dochází k nevratnému poškození a nekróze buněk (Ferdinandy, *et al.*, 2007; Hausenloy a Yellon, 2013), viz obr. 8.

Během reperfuze dochází k navrácení kyslíku a živin a odplavení laktátu. Odplavení laktátu spolu s činností Na^+/H^+ transportéru umožňuje rychlé obnovení fyziologického pH. Náhlý přísun molekulárního kyslíku reenergizuje mitochondrie a reaktivuje elektron-transportní řetězec, čímž dochází k obnově produkce ATP, ale také masivní produkci volných kyslíkových radikálů (ROS, reactive oxygen species). Na produkci ROS se navíc podílí také xantinoxidáza nacházející se v endoteliálních buňkách (Ferdinandy, *et al.*, 2007; Hausenloy a Yellon, 2013).

Již během ischemie byly srdeční buňky přetíženy vysokou koncentrací Ca^{2+} . Během reperfuze toto přetížení dále pokračuje a navíc je umocňováno působením ROS, které poškozují membránu SR a způsobují tak další uvolňování Ca^{2+} . Regulace hladiny Ca^{2+} je zcela narušena a Ca^{2+} se kumuluje v cytosolu a v mitochondriích.

Vysoká hladina Ca^{2+} , spolu s ATP a obnoveným pH, indukuje hyperkontrakuru myofibril (chronická kontrakce), která vede k letálnímu poškození myocytů. Fyziologické pH dále v kombinaci s vysokou hladinou Ca^{2+} v mitochondriích a aktivitou ROS indukuje otevření mitochondriálních pórů přechodné permeability (mPTP, mitochondrial permeability transition pore). Otevření mPTP způsobuje rozprášení elektron-transportního řetězce, depolarizaci vnitřní mitochondriální membrány a bobtnání mitochondrií, které vede k prasknutí vnější mitochondriální membrány. Tím dochází k vyplavování cytochromu c a následné aktivaci kaskády kaspáz, které iniciují buněčnou degradaci vedoucí k buněčné smrti.

Aktivita ROS způsobuje denaturaci enzymů, poškození buněčné membrány lipidovou peroxidací a přímé oxidativní poškození DNA. Zároveň ROS působí jako chemoatraktant pro neutrofilů, které se během několika hodin po reperfuzi akumulují v infarktové tkáni. Neutrofilů se poté výrazně podílí na dalším poškození a odumírání tkáně myokardu tím, že způsobují ucpávání cév, uvolňují degradativní enzymy a produkují další ROS pomocí NADPH (nikotinamidadenin dinukleotidfosfát) oxidázy. (Ferdinandy *et al.*, 2007; Yellon a Hausenloy, 2007; Heusch *et al.*, 2010; Hausenloy a Yellon, 2013) viz obr. 8.



Obr. 8: Schematická ilustrace hlavních dějů vedoucích k ischemicko-reperfuznímu poškození myokardu (upraveno podle Hausenloy a Yellon, 2013).

2.6. Kardioprotektivní působení morfinu

2.6.1. Úloha EOP v ischemickém preconditioningu

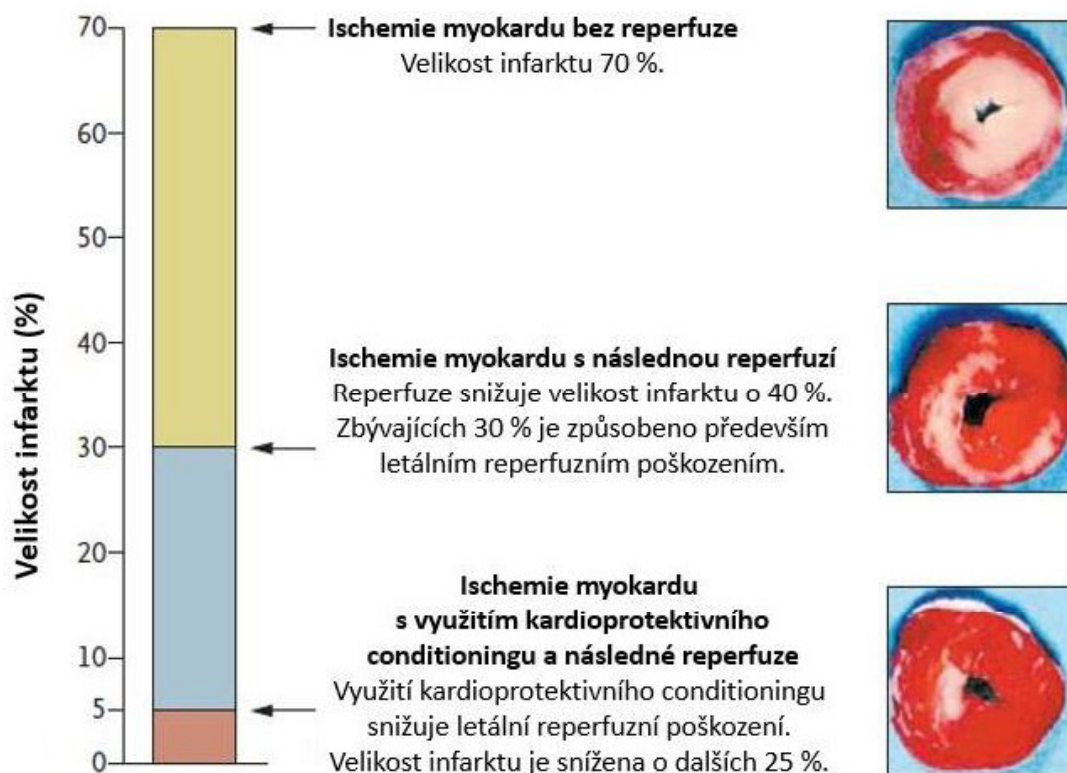
Murry *et al.* v roce 1986 poprvé popsal kardioprotektivní fenomén ischemického preconditioningu (IPC). Princip IPC spočívá v navození několika krátkých ischemických period v koronárních tepnách, které ale nejsou natolik závažné, aby způsobily poškození srdeční tkáně. Zároveň platí, že pokud je po IPC navozena dlouhodobá ischemie, dochází k signifikantnímu snížení I-R poškození.

S ohledem na studie poukazující na nárůst enkefalinů v srdečních komorách potkanů v průběhu stárnutí (Boluyt *et al.*, 1993) a po infarktu myokardu (Paradis *et al.*, 1992) byla vyslovena teorie, že IPC zvyšuje hladinu EOP, které se poté podílejí na kardioprotektivním působení. Tato teorie byla prokázána, když nespecifický antagonist OR naloxon, aplikovaný před nebo těsně po IPC, kompletně zrušil protektivní účinek IPC. Tento experiment tak poprvé na potkaním modelu *in vivo* dokázal, že aktivace OR může hrát důležitou roli v kardioprotekci (Schultz *et al.*, 1995). Úloha EOP v protektivním působení IPC byla později prokázána také na králičím srdci *in vivo* (Chien a Winkle, 1996), izolované lidské síňové trabekule (Kunecki *et al.*, 2017) a také u pacientů podstupujících koronární angioplastickou operaci (Tomai *et al.*, 1999). Na protektivním působení morfinu se podílí stimulace periferních OR, jelikož i.v. aplikace kvarterního derivátu naloxonu, který není schopen procházet hematoencefalickou bariérou, zcela ruší protektivní efekt IPC (Schultz *et al.*, 1997). Naopak zablokování OR v CNS nemá na protekci žádný vliv (Lu *et al.*, 2011).

2.6.2. Morfinový conditioning

Vliv morfinu na I-R poškození byl poprvé zkoumán na potkanech již roku 1982. Důvodem bylo ověření vhodnosti použití morfinové anestezie u pacientů s infarktem myokardu. Podání 3 mg/kg morfinu před ischemií nicméně zvýšilo poškození srdce, takže se jeho použití nezdálo být vhodné (Markiewicz *et al.*, 1982). Pozdější studie provedená na potkaních srdcích *in situ* ale ukázala, že aplikace 0,3 mg/kg morfinu před dlouhodobou ischemií – morfinový preconditioning (MPC) dokáže navodit stejnou míru protekce jako

IPC (Schultz *et al.*, 1996). Rozdílné pozorování těchto studií bylo pravděpodobně způsobeno odlišným experimentálním uspořádáním. Zásadní roli mohla mít patrně skutečnost, že ve studii Markiewicz *et al.* (1982) nebyla po ischemii provedena reperfuze.



Obr. 9: Hypotetická redukce infarktu myokardu při reperfuzi a při využití kardioprotektivního conditioningu. Obrázek ukazuje hypotetickou redukcí velikosti infarktu při časně a úspěšné reperfuzi po akutním infarktu myokardu. Prospěšný efekt reperfuze je nicméně snížen přítomností letálního reperfuzního poškození. Při využití kardioprotektivní strategie, jako je například ischemický nebo morfinový conditioning, lze dosáhnout snížení letálního reperfuzního poškození a tím i dalšího snížení velikosti infarktu. Myokard zasažený infarktem je vyobrazen světle růžovou barvou, životaschopná část myokardu je obarvena červeně. Velikost infarktu je vyjádřena jako procento z celkového objemu myokardu ohroženého infarktem (upraveno podle Yellon a Hausenloy, 2007).

Jelikož MPC navozuje protekci také v kulturách izolovaných kuřecích srdečních ventrikulárních kardiomyocytů, lze předpokládat, že protektivní efekt může být přenášen i na úrovni jednotlivých buněk (Liang a Gross, 1999; McPherson a Yao, 2001). Současné platí, že v izolovaných kulturách kuřecích kardiomyocytů působily protektivně pouze nízké dávky morfinu - 1 μ M (Liang a Gross, 1999). Naopak v králičím srdci *in situ* byly protektivní pouze vysoké dávky morfinu - 3 mg/kg (Miki *et al.*, 1998).

Studie provedená na králících zároveň ukázala, že MPC zlepšuje srdeční funkce levé komory a tento protektivní efekt přetrvává i 28 dní po indukované ischemii. Morfin tak pravděpodobně dokáže snížit míru remodelace levé srdeční komory, ke které dochází po infarktu v důsledku nerovnováhy mezi přežívajícími a odumírajícími myocyty. Remodelace srdeční tkáně přitom může vést až k srdečnímu selhání (Liu *et al.*, 2011).

Kardioprotektivní působení morfinu je připisováno aktivaci DOR (Schultz *et al.*, 1997; Okubo *et al.*, 2004). Studie provedené na kuřecích kardiomyocytech pak konkrétně označují DOR1 (Liang a Gross, 1999; McPherson a Yao, 2001). Při podání morfinu *in vivo* je pro vyvolání protektivního působení důležitá aktivace periferních i centrálních OR (Lu *et al.*, 2011). Recentní studie navíc ukazuje, že při srdečním selhání vyvolaném podáváním protinádorového léku doxorubicinu, dochází v srdeční tkáni k výraznému zvýšení exprese MOR. Aplikace morfinu pak snižuje v těchto selhávajících srdcích I-R poškození právě skrze aktivaci MOR (He *et al.*, 2018).

Molekulární mechanismy přenosu protektivního působení MPC nejsou zatím zcela objasněny a pravděpodobně nejsou nikterak triviální. Dosavadní studie prozrazují, že zásadní význam v morfinem vyvolané kardioprotekci mají dále popsání mechanismy.

2.6.2.1. Otevírání mitochondriálních ATP senzitivních K⁺ kanálů a produkce ROS

Důležitou roli v protekci hraje otevírání mitochondriálních ATP senzitivních K⁺ (mitoK_{ATP}) kanálů, které má za následek produkci volných radikálů. Blokace mitoK_{ATP} i blokace produkce volných radikálů inhibovala protektivní efekt MPC v izolovaných kuřecích kardiomyocytech (McPherson a Yao, 2001) i u potkanů *in vivo* (Peart a Gross, 2003). Aktivace mitoK_{ATP} kanálů s následnou produkcí ROS měla stěžejní roli také v morfinem indukované protekci *in vitro* v H9c2 kardiomyoblastech. Zvýšená hladina ROS inhibovala protein serin/threonin fosfatázu (PP2A), čím došlo ke zvýšení

aktivity jejího substrátu Akt. Podání inhibitoru PP2A přitom vykazovalo stejnou míru protekce jako působení morfinu (Xu *et al.*, 2011).

Fräßdorf *et al.* (2010) ve své studii popisuje, že pozitivní efekt MPC byl v izolovaných potkaních srdcích závislý také na aktivaci Ca^{2+} senzitivních K^+ (mitoK_{Ca}) kanálů. Vzhledem k tomu, že aktivaci mitoK_{Ca} kanálů zajišťuje PKA, Dorsch *et al.* (2016) otestoval její vliv na protektivní efekt MPC u potkanů *in vivo*. Výsledky těchto experimentů ukázaly, že podání inhibitoru PKA - H-89, může zcela potlačit protektivní působení MPC. Tento výsledek je však poněkud kontroverzní, jelikož akutní působení opioidů je spojeno s inhibicí AC a tím i sníženou produkcí cAMP, na kterém je aktivita PKA závislá (Williams *et al.*, 2001). Podobný výsledek ale měla i dřívější studie provedená na myších srdcích. Autoři zde použili dva inhibitory PKA – H-89 a PKI (14-22 amid). Zatímco H-89 zablokoval protektivní působení MPC, PKI neměl na protekci vliv. Autoři to vysvětlují nedostatečnou selektivitou inhibitoru H-89 pro PKA (Peart a Gross, 2006).

Prvotní studie zabývající se MPC naznačovaly, že by protektivní efekt morfinu mohl být závislý také na aktivaci sarkolemálních ATP senzitivních K^+ (sarcK_{ATP}) kanálů (Schultz *et al.*, 1996; Liang a Gross, 1999). V obou případech byl ale ke studiu vlivu sarcK_{ATP} kanálů použit neselektivní inhibitor glibenclamide, který působí také na mitoK_{ATP} kanály. Kardioprotekce vyvolaná podáním agonisty DOR - TAN-67 nebyla ale potlačena selektivním inhibitorem sarcK_{ATP} kanálů - HMR 1089. Aplikace HMR 1089 naopak působila spíše protektivně, jelikož zabránila výskytu ventrikulárních fibrilací, které postihly 60% kontrolních zvířat (Fryer *et al.*, 2000). Lze tedy usuzovat, že aktivace sarcK_{ATP} kanálů nehraje v protektivním působení MPC stěžejní roli.

2.6.2.2. Aktivace PKC

Aktivace PKC přenášela protektivní působení MPC v izolovaných králíčích (Miki *et al.*, 1998) i myších srdcích (Peart a Gross, 2006). K aktivaci může pravděpodobně docházet klasickou signalizační drahou OR, kdy PLC štěpení PIP2 na IP₃ a DAG. Uvolněný IP₃ mobilizuje z vnitrobuněčných zásobáren Ca^{2+} , který společně s DAG aktivuje PKC (Barry a Zuo, 2005). K této teorii přispívá fakt, že protektivní efekt MPC byl na modelu izolovaných neonatálních potkaních kardiomyocytů závislý na IP₃ a Ca^{2+}

(Barrère-Lemaire *et al.*, 2005). Nicméně selektivní agonista DOR1 indukoval v kuřecích kardiomyocytech protektivní působení skrze aktivaci signální dráhy NOS/NO/PKC- δ (Zhang *et al.*, 2002). Je tedy možné, že během MPC může být PKC aktivována také působením NO, který patří mezi volné dusíkaté radikály.

2.6.2.3. Inhibice GSK-3 β a otevírání mPTP

Klíčovým krokem kardioprotektivního působení morfinu je inaktivace GSK-3 β (Gross *et al.*, 2004). Inhibice GSK-3 β zamezuje otevírání mPTP a tak napomáhá udržovat membránový potenciál mitochondrie, jehož ztráta je spojená se ztrátou respirační funkce mitochondrií a extenzivní produkcí ROS (Juhaszova *et al.*, 2004; Obame *et al.*, 2008). Inhibitor GSK-3 β (SB 216763) přitom dokáže snížit I-R poškození ve stejné míře jako MPC. Pro inaktivaci GSK-3 β je zásadní její fosforylace na serinovém zbytku Ser⁹. Během MPC u potkana tuto fosforylaci zprostředkovávají kináza mTOR (mammalian target of rapamycin), PI3K (Gross *et al.*, 2004) a ERK (He *et al.*, 2015). PI3K/Akt a MAPK dráha ERK zajišťují kardioprotektivní působení celé řady dalších substancí (například inzulinu nebo bradykininu) a díky tomu jsou označovány jako kinázy zachraňující reperfuční poškození (RISK, reperfusion injury salvage kinase) (Hausenloy a Yellon, 2004).

Pokud je GSK-3 β aktivní, může fosforylovat a tak předurčit k degradaci HSP90. Inhibice HSP90 nicméně zcela ruší protektivní působení MPC u potkanů *in vivo*. Nezbytnost HSP90 pravděpodobně spočívá v tom, že umožňuje translokaci protektivně působících proteinů do mitochondrie. Jestliže je GSK-3 β inhibována, HSP90 se váže na transportní komplex vnější mitochondriální membrány TOM (translocase of the outer membrane) a zprostředkovává transport proteinů do mitochondrie (Small *et al.*, 2015). Prozatím však neexistuje studie, která by identifikovala konkrétní kardioprotektivní proteiny, k jejichž translokaci do mitochondrií během MPC dochází. Nicméně mezi proteiny, které jsou translokovány do mitochondrie pomocí HSP90, patří například Akt (Barksdale a Bijur, 2009) nebo PKC- ϵ (Budás *et al.*, 2010). Podle dosavadních studií je aktivita Akt v mitochondriích spojená s buněčným přežíváním a regulací respirace. PKC se pak v mitochondriích zapojuje do regulace respirace, K⁺ kanálů a apoptózy (Lim *et al.*, 2016). Je tedy možné, že právě translokace Akt a PKC do mitochondrií má během MPC zásadní vliv na zprostředkování kardioprotektivního efektu.

Na modelu izolovaných potkaních kardiomyocytů bylo dále zjištěno, že MPC aktivuje signální dráhu NO/cGMP/proteinkináza G (PKG), která vede k uvolnění intracelulárního Zn^{2+} . Zvýšená hladina Zn^{2+} poté inhibuje GSK-3 β a tak zabraňuje otevření mPTP (Xi *et al.*, 2010). Současně zvýšená hladina NO a Zn^{2+} v potkaních kardiomyocytech zvyšuje fosforylaci (a aktivitu) mitochondriální Src tyrozinkinázy (Zhang Y. *et al.*, 2013). Tato kináza pak přímo v mitochondriích potkaních kardiomyocytů přenáší protektivní působení MPC tím, že inhibuje aktivitu komplexu I elektron-transportního řetězce a zabraňuje tak extenzivní produkci ROS (He, H. *et al.*, 2016).

2.6.2.4. JAK/STAT signální dráha

Pomocí signální dráhy Janus tyrozinkináza (JAK)/signální přenašeč a aktivátor transkripce (STAT, signal transducer and activator of transcription) dokáže buňka reagovat na široké spektrum podnětů přicházejících z okolí a v odpovědi na ně následně regulovat genovou transkripci (Bolli *et al.*, 2003). JAK/STAT signální dráha je zpravidla aktivována receptory, které po vazbě ligandu dimerizují a jejichž cytoplazmatické část obsahuje vazebný motiv pro JAK. Dimerizace receptoru umožňuje navázání dvou molekul JAK, které se tak dostanou do těsné blízkosti a mohou se navzájem fosforylovat. Tím dochází k aktivaci JAK, které dále fosforylují transkripční faktor STAT. Fosforylovaný STAT dimerizuje a vstupuje do jádra, kde se váže na regulační sekvence a aktivuje nebo potlačuje transkripci cílových genů. Typickým receptorem, který umožňuje aktivaci JAK, je například cytokinový receptor. Aktivaci mohou ale zajišťovat také tyrozinkinázové receptory (RTK) a pravděpodobně i GPCR (Rawlings *et al.*, 2004).

Gross *et al.*, (2006) ve své studii popisuje, že protektivní působení MPC bylo u potkanů *in vivo* doprovázeno zvýšenou fosforylací STAT3, GSK-3 β a Akt. Zároveň podání inhibitoru JAK2 potlačilo protektivní efekt MPC i fosforylaci všech tří zmíněných proteinů. Fosforylace STAT3 byla potlačena také při inhibici PI3K. Z toho vyplývá, že během protektivního působení dochází ke crosstalku signalizačních kaskád PI3K/Akt a JAK/STAT. Recentní studie Dorsch *et al.*, (2016) současně uvádí, že také inhibice STAT3 potlačuje protektivní působení MPC.

Ačkoliv je princip aktivace JAK/STAT signální dráhy při MPC zatím nejasný, studie provedená na buněčné linii potkaních kardiomyoblastů H9c2 napovídá, že protektivní působení MPC může být spojeno s aktivací RTK. Konkrétně z této studie vyplývá, že je protektivní efekt závislý na aktivaci RTK pro epidermální růstový faktor (EGFR TK, epidermal growth factor receptor tyrosine kinase). Současně EGFR TK přenáší protektivní působení indukci produkce ROS a fosforylací Akt (Xu *et al.*, 2012).

2.6.2.5. Crosstalk s dalšími receptory

Morfin i agonista A_1 adenosinových receptorů (AR) dokáží každý samostatně navodit protekci proti I-R poškození u potkanů. Pokud ale dojde k zablokování OR, kardioprotektivní efekt aktivace A_1 AR je potlačen. A naopak, blokace A_1 AR inhibuje protektivní účinek aktivace OR. Zároveň je kardioprotektivní efekt aktivace A_1 AR i OR potlačen při blokaci A_3 AR a to i v případě jsou-li oba receptory aktivovány současně (Peart a Gross, 2003).

Jak již bylo zmíněno výše, přenos protektivního signálu morfinu může zajišťovat také crosstalk s RTK (Xu *et al.*, 2012). Dlouhodobé působením morfinu (5 dní) u myši pak vyvolávalo protektivní efekt, do kterého byla zapojena aktivace β_2 -AR a $G\alpha_s$ (Peart a Gross, 2006).

2.6.2.6. MikroRNA

MikroRNA (miRNA) jsou jednovláknové, přibližně 22 nukleotidů dlouhé řetězce nekódující RNA, které negativně regulují genovou expresi skrze degradaci nebo inhibici translace jejich specifických cílových messenger RNA. Recentní studie popisují, že se miRNA zapojují také do protektivního efektu MPC. V primárních potkaních kardiomyocytech indukuje MPC změnu exprese 39 miRNA (ze 722 studovaných). K největší upregulaci dochází u miR-133b-5b, která přímo inhibuje expresi proteinu Fas. Tento protein přitom působí jako spouštěč buněčné smrti. Experimenty provedené na buněčné linii potkaních kardiomyoblastů H9c2 zároveň ukazují, že zatímco indukovaná overexprese miR-133b-5b dokáže navodit stejnou protekci jako MPC, inhibice miR-133b-5b protektivní působení MPC blokuje (He, S.-F. *et al.*, 2016). Další studie tyto

výsledky na modelu primárních potkaních kardiomyocytů potvrzuje. A navíc dodává, že MPC na rozdíl od IPC dokáže up-regulovat miR-133b-5b, down-regulovat expresi proteinu Fas a navodit protekci před I-R poškozením také u kardiomyocytů získaných ze srdcí, ve kterých bylo navozeno chronické srdeční selhání podáváním doxorubicinu (Zhu *et al.*, 2017).

2.6.2.7. Morfinový postconditioning

Podání morfinu těsně před reperfuzí – morfinový postconditioning (MPOC) vykazuje u potkanů *in vivo* stejnou míru kardioprotekce jako MPC (Gross *et al.*, 2004). Kombinace MPC a MPOC *in vitro* na potkaním srdci ale nepřináší vyšší míru protekce, než je každá ze zmíněných kardioprotektivních strategií schopná navodit samostatně (Chen *et al.*, 2008).

Kardioprotektivní efekt MPOC je přenášen pravděpodobně aktivací DOR (Jang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011), konkrétně DOR1 (Kim *et al.*, 2011). Nicméně ve studii, kde byl morfin podán současně se zahájením reperfuze, byla protekce přenášena KOR a aktivace DOR nehrála v protekci roli. Zároveň ve stejné studii působilo kardioprotektivně i samostatné podání neselektivního inhibitoru OR naloxonu, inhibitoru DOR a inhibitoru KOR (Chen *et al.*, 2008).

Protektivní efekt MPOC je v izolovaných potkaních kardiomyoblastech spojen s inhibicí mPTP. Mitochondrie získané ze srdce potkana s MPOC vykazují výrazné zlepšení respiračních funkcí, zvýšenou resistenci k přetížení Ca^{2+} a tím i zvýšenou rezistenci k otevření mPTP. Přitom platí, že spíše než k úplné inhibici otevření mPTP, dochází během MPOC k oddálení otevření mPTP. Působení morfinu ale dokáže oddálit otevření mPTP ve stejné míře jako cyklosporin A, který je považován za přímý inhibitor mPTP. MPOC navíc zabraňuje lipidové peroxidaci, což svědčí o tom, že jeho působení zabraňuje extensivní produkci ROS. Popsaný protektivní efekt MPOC dokáže velmi podobně napodobit inhibitor GSK-3 β – SB 216763 (Obame *et al.*, 2008) a je tak pravděpodobné, že zásadní roli v MPOC bude hrát stejně jako u MPC právě inhibice GSK-3 β (Gross *et al.*, 2004). Navíc platí, že protektivní působení MPOC může být zprostředkováno signální dráhou NO/cGMP/PKG (Jang *et al.*, 2008). Stejná signální dráha je aktivována také během protektivního působení MPC a vede k uvolnění

intracelulárního Zn^{2+} . Zvýšená hladina Zn^{2+} poté inhibuje GSK-3 β a tak zabraňuje otevření mPTP (Xi *et al.*, 2010).

Důležitou roli v protektivním působení MPOC hraje také aktivace draslíkových kanálů sarcK_{ATP} (Gross *et al.*, 2007), mitoK_{ATP} (Gross *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008) a mitoK_{Ca} (Huhn *et al.*, 2010). Aktivace sarcK_{ATP} a mitoK_{ATP} je přitom závislá na působení PI3K. Zároveň pouze současná aktivace sarcK_{ATP} a mitoK_{ATP} zprostředkovává protektivní efekt SB 216763 (Gross *et al.*, 2007).

Další studie ukazují, že MPOC dokáže vylepšit srdeční funkce v izolované lidské trabekule (Fuaro *et al.*, 2013) a v izolovaných potkaních srdcích. V izolovaných potkaních srdcích MPOC zároveň dokáže snížit I-R poškození, inhibovat otevírání mPTP a uvolňování cytochromu c (Chen *et al.*, 2016a; Chen *et al.*, 2016b). Tento kardioprotektivní efekt je přenášen inhibicí JNK a p38 MAPK (Chen *et al.*, 2016b) a aktivací PKC- ϵ , která indukuje fosforylaci (a aktivaci) ERK, jejíž činnost dále zabraňuje otevření mPTP (Chen, *et al.*, 2016a). MPOC zvyšuje také fosforylaci HSP27 (Mourouzis *et al.*, 2009), který působí během stresových podmínek ischemie cytoprotektivně a podporuje přežívání buněk tím, že funguje jako molekulární chaperon a stabilizuje aktin (Peart *et al.*, 2007).

Signální dráhy přenášející protektivní působení MPC a MPOC jsou pravděpodobně velmi podobné a jejich přehled je zobrazen na obrázku 10. Výsledky studií se však zcela neshodují na působení signální dráhy p38 MAPK. Zatímco, Chen *et al.* (2016b) popisuje, že protektivní efekt MPOC je přenášen inhibicí p38 MAPK, Zhang *et al.* (2007) ve své práci uvádí, že MPC naopak vyžaduje aktivaci p38 MAPK.

Nástup ischemie nelze zpravidla předpokládat a proto má z klinického hlediska MPC menší potenciál než MPOC, který je využitelný také během akutního infarktu myokardu nebo ischemie, která může nastat náhle v průběhu chirurgického zákroku (Headrick *et al.*, 2015).

a gp100^{MEL14} (potkaní analog L-selektinu) a zprostředkovat kardioprotektivní efekt MPC (Wang *et al.*, 1998).

Během infarktu myokardu a srdečního selhání dochází ke zvýšenému uvolňování endotelinu (ET), ten působí silně vasokonstrikčně a může přispívat ke zhoršení hemodynamických funkcí srdce. Zvýšená hladina ET je významně spojená se zvýšenou úmrtností pacientů po infarktu myokardu (Omland *et al.*, 1994). Vyrůstající aktivita NEP byla pravděpodobně zodpovědná také za snížení hladiny ET 1, které bylo pozorováno u pacientů s akutním infarktem myokardu (Wang a Chang, 2001) a kongestivním srdečním selháním (Wang a Hung, 2003) po podání morfinu.

2.6.3. Chronický morfinový preconditioning

Již v roce 1987 bylo zaznamenáno, že chronické 3týdenní podávání morfinu potkanům v pitné vodě dokázalo na rozdíl od akutního podání morfinu signifikantně snížit počet ventrikulárních tachykardií a fibrilací, které byly vyvolané ischemií myokardu (Chan *et al.*, 1987). Podrobněji byl ale tento fenomén zkoumán až později na myším modelu, přičemž chronické působení morfinu bylo indukováno podkožní implantací 75mg morfinové pelety na dobu 5 dní. Výsledky těchto experimentů ukázaly, že chronický morfinový preconditioning (ChMPC) dokázal navodit výraznější protekci před I-R poškozením než akutní podání morfinu (Peart a Gross, 2004a, 2004b, 2006; Peart *et al.*, 2011). Zároveň byl ChMPC schopen vyvolat protekci až 7 dní po odebrání morfinové pelety (Peart *et al.*, 2011) a na rozdíl od MPC dokázal navodit kardioprotekci také v srdcích, která byla odebrána ze starých jedinců (Peart a Gross, 2004a).

Protektivní efekt ChMPC je přenášen aktivací DOR, $G\alpha_s$, β_2 -AR a částečně i PI3K. Na rozdíl od MPC je ale zcela nezávislý na aktivaci $G\alpha_i$, PKC, mTOR, cRaf1 kinázy (MAPKKK ERK dráhy), mitoK_{ATP} kanálů a NOS. Role PKA v protektivním působení ChMPC je diskutabilní, jelikož dvě studie jedné výzkumné skupiny přinesly zcela rozdílné výsledky (Peart a Gross, 2006; Peart *et al.*, 2011). Ačkoli je kardioprotektivní efekt ChMPC a MPC velmi pravděpodobně přenášen rozdílnými signálními drahami, kombinace těchto kardioprotektivních strategií nepřináší zesílený protektivní účinek. Zesílené kardioprotekce může být ale dosaženo kombinací ChMPC s akutní aktivací AR (Peart *et al.*, 2011). Protektivní efekt ChMPC je u myši současně

spojen s výraznou represí exprese imunitních a prozánětlivých mediátorů a upregulací exprese kontraktilních proteinů sarkomery a natriuretických peptidů. Dále dochází k regulaci komponent signálních drah zapojených do buněčného stresu, růstu a vývoje. Naopak exprese proteinů, které „běžně“ zprostředkovávají protekci, zůstává zpravidla nezměněna (Ashton *et al.*, 2013).

Klasický preconditioning je schopný navodit akutní protekci, která přetrvává přibližně 1 - 2 h a opožděnou, méně účinnou protekci, která přetrvává přibližně 2 - 3 dny. Výhodou chronického preconditioningu tedy je, že dokáže zajistit silnější a déletrvající kardioprotekci, která je účinná i u starších jedinců. Chronický preconditioning by tak mohl být užitečný jako profylaktická terapie pro plánované operace, která může zmírnit poškození tkáně během operace i po ní (Williams-Pritchard *et al.*, 2011). Dlouhodobé podávání morfinu může být ale spojeno s rozvojem nepříznivých vedlejších účinků. Případné klinické využití chronického preconditioningu by tak bylo zajímavé spíše u potenciálních syntetických analogů morfinu se sníženou schopností vyvolávat nepříznivé vedlejší účinky (Peart a Gross, 2004a).

2.6.4. Morfinový conditioning na dálku

Novým fenoménem posledních let se stal ischemický preconditioning na dálku (RIPC, remote ischemic preconditioning). Princip RIPC spočívá v navození IPC v cévě nacházející se mimo srdeční tkáň, například v končetině. Několik krátkých cyklů ischemie a reperfuze ve vzdálené tkáni přitom působí kardioprotektivně a dokáže ochránit myokard před dlouhodobou ischemií. RIPC se již nyní používá v klinické praxi u pacientů, kteří podstupující různé chirurgické zákroky srdce (Randhawa a Jaggi, 2017). Velmi dobré výsledky přináší také ischemický postconditioning na dálku, který dokáže snížit reperfuzní poškození u pacientů s akutním infarktem myokardu (Bøtker *et al.*, 2010).

Důležitou roli v přenosu protektivního signálu RIPC hrají EOP a aktivace centrálních OR (Wong *et al.*, 2012a). Aplikace morfinu potkanům pak dokáže snížit práh pro indukci protektivního působení RIPC. Zatímco jeden cyklus ischemie/reperfuze RIPC nebo podání 0,1 mg/kg morfinu nejsou dostatečné k vyvolání kardioprotekce, při

kombinaci obou strategií dochází ke srovnatelné protekci, jakou jsou schopny navodit tři cykly ischemie/reperfuze RIPC (Lu *et al.*, 2012).

Zahn *et al.* (1997) popisuje, že pro navození stejného efektu modulace bolesti jako má i.v. morfin, je potřeba 1000x menší dávka morfinu podaného intratekálně (i.t.; podání do subarachnoideálního (mezi mozkové pleny *piu mater* a arachnoideu) prostoru míšního kanálu). Groban *et al.* (2004) ve své studii ukázal, že podobný princip platí také při i.t. podání morfinu potkanům během MPC, tedy morfinovém preconditioningu na dálku (RMPC), když i velmi nízké dávky morfinu (0,3 µg/kg) podané i.t. dokázaly snížit velikost infarktu ve stejném rozsahu jako vysoké dávky morfinu (0,3 mg/kg) podané intravenózně.

Kardioprotekce vyvolaná RMPC je závislá na aktivaci MOR, KOR i DOR (Li *et al.*, 2009) v CNS, periferní OR pravděpodobně zapojeny nejsou (Wong *et al.*, 2010). Protektivní signál je po aktivaci míšních OR přenášen autonomními vlákny (Wong *et al.*, 2012b), které zřejmě ovlivňují uvolnění centrálně a periferně aktivních mediátorů (Headrick *et al.*, 2015) jako je adenosin (Yao *et al.*, 2011), bradykinin (Wong *et al.*, 2012b) a peptid příbuzný genu pro kalcitonin (CGRP, calcitonin gene-related peptide) (Zhang *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2012b). Každý z výše zmíněných mediátorů je přitom dobře znám pro svou schopnost indukovat kardioprotekci (Kleinbongard *et al.*, 2017).

Následující studie pak přinášejí několik dalších poznatků o signálních mechanismech, které vyvolává působení RMPC.

- 1) Protektivního signál je zprostředkováván NOS/NO/GC/cGMP/PKG signální dráhou v CNS (Lu *et al.*, 2015) a také aktivací centrálních i periferních AR (Yao *et al.*, 2011).
- 2) V CNS dochází pomocí aktivace všech tří typů OR ke zvýšení aktivity kalmodulinu (CaM), který svou činností následně vyvolává zvýšení hladiny CGRP v plazmě (Zhang *et al.*, 2011). Další studie na jiném modelu zároveň popisují, že CaM může pravděpodobně aktivovat NOS (Spratt *et al.*, 2007) a NO může indukovat uvolňování CGRP (Du *et al.*, 2004). Je tedy možné, že RMPC aktivuje protektivní signální dráhu CaM/NOS/NO/CGRP.

- 3) V srdeční tkáni se zvyšuje aktivita Akt, endoteliální NOS (eNOS) a K_{ATP} kanálů. Současně je protekce přenášena CGRP a bradykininem (Wong *et al.*, 2012b). V jiné studii přitom bradykinin indukoval kardioprotekci právě aktivací signální dráhy PI3K/Akt/eNOS (Bell a Yellon, 2003).

Kardioprotektivní efekt přináší také morfinový postconditioning na dálku (RMPOC). Protekce je podobně jako při RMPC přenášena aktivací MOR, KOR a DOR v CNS, vliv periferních OR nebyl prokázán. Dále se na protektivním působení zásadně podílí aktivace AR a CGRP receptorů (Ling Ling *et al.*, 2010) a signální dráha neuronální NOS/NO/GC/cGMP v CNS (Jiang *et al.*, 2016).

2.6.5. In vivo lidské studie

Murphy *et al.* postupně provedl tři klinické studie na vzorku 46 (2006), 30 (2007) a 90 pacientů (2009) podstupujících srdeční operaci s využitím kardiopulmonárního bypassu (CPB). Výsledky těchto studií ukazují, že aplikace 40 mg morfinu před začátkem operace dokáže při porovnání s aplikací 0,6 - 1 mg fentanylu (syntetický agonista MOR) signifikantně zlepšit funkce levé komory (Murphy *et al.*, 2006), snížit zánětlivou reakci během operace (Murphy *et al.*, 2007) a zvýšit kvalitu života po operaci (Murphy *et al.*, 2009).

Podání morfinu vykazuje kardioprotektivní účinky také při operacích spojených s náhradou některé ze srdečních chlopní. MPOC aplikovaný přímo do aorty v dávce 0,1 mg/kg u skupiny 50 pacientů vylepšil pooperační kardiopulmonární funkce, snížil hladinu troponinu (udává míru proteolytické degradace tkáně), zkrátil délku užití mechanické ventilace a pobytu na jednotce intenzivní péče (JIP) (Omran, 2017). Účinné bylo také i.t. podání 0,7 μ g/kg morfinu před zahájením operace – RMPC. Skupina 22 pacientů s RMPC vykazovala oproti kontrolní skupině lepší hemodynamické funkce, lepší anestezii, dřívější extubaci (odstranění endotracheální rourky z průdušnice) a propuštění z JIP (Elgendy a Helmy, 2017).

Beattie *et al.* (1993) se ve své klinické studii rozhodl srovnat vliv i.v. (n = 26) a epidurální (mezi obratel a tvrdou plenu mozkovou, n = 29) morfinové anestezie

u pacientů podstupujících neakutní operaci s rizikem rozvoje ICHS. Výsledky této studie ukázaly, že u pacientů, kterým byl morfin aplikován epidurálně, dochází 3x méně často k rozvoji ventrikulárních tachykardií a 4x méně k rozvoji ICHS, než u pacientů s i.v. morfinovou anestezií.

Ačkoli existovaly obavy, že by použití morfinové anestezie u dětských pacientů mohlo mít za následek nutnost déletrvající mechanické ventilace a pozdější extubace. Studie, která zpětně srovnávala délku pobytu na JIP u dětských pacientů po operaci vrozené srdeční vady ukázala, že použití morfinové anestezie nejenže pobyt na JIP neprodlužuje, ale může ho i zkrátit. V tomto případě byla srovnávána malá skupina 23 dětských pacientů s morfinovou anestezií se skupinou 144 dětských pacientů s jiným druhem anestezie (Asaf *et al.*, 2011). Podobný závěr měla ale i pozdější studie, do které bylo zapojeno celkem 89 dětských pacientů podstupujících korektivní operaci vrozené srdeční vady. Polovině pacientů byl před reperfuzí (odpojením CPB) aplikován morfin v dávce 0,1 mg/kg přímo do aorty. Při srovnání se stejně velkou kontrolní skupinou, dokázal MPOC u dětských pacientů zlepšit pooperační srdeční funkce, snížit hladinu troponinu, zkrátit délku užití mechanické ventilace a snížil dobu pobytu na JIP (Zhang R. *et al.*, 2013).

Díky silným analgetickým účinkům je morfin běžně podáván pacientům s akutním infarktem myokardu spojeným s elevacemi ST segmentu na elektrokardiografickém záznamu (STEMI, ST elevation myocardial infarction). K aplikaci morfinu dochází zpravidla před reperfuzí, tedy před provedením primární perkutánní koronární intervence (PPCI, opětovné rozšíření koronárních cév, nebo odstranění jejich úplných uzávěrů). Studie zabývající se prospěšností/škodlivostí morfinu u pacientů se STEMI ale nemají zcela jednoznačný závěr. Podle výsledků studie de Waha *et al.* (2015) byla i.v. aplikace morfinu u pacientů se STEMI (n = 123) při srovnání s kontrolami (n = 153) spojena s nižší účinností reperfuze. Podobné výsledky přinesla také studie Bellandi *et al.* (2016), která shodně popisuje sníženou účinnost reperfuzní terapie po aplikaci morfinu u 74 pacientů se STEMI. Zároveň tato studie poukazuje na fakt, že morfin opoždí reakci na antitrombotickou léčbu, která má u pacientů se STEMI snižovat agregaci krevních destiček. Tento fakt potvrzuje i recentní studie Farag *et al.* (2018), ve které byl morfin aplikován 218 pacientům se STEMI. Autoři popisují, že podání morfinu bylo sice spojeno se sníženou účinností reperfuzní terapie, nicméně podání inhibitoru destičkových

glykoproteinových receptorů IIb/IIIa, jejichž stimulace vede k aktivaci krevních destiček, zcela zamezilo negativnímu efektu morfinu na účinnost reperfuze.

Několik studií ale naopak popisuje příznivé účinky morfinu na léčbu akutního infarktu. Aplikace 5 mg morfinu 30 min před PPCI dokázala u 46 pacientů se STEMI (při porovnání s kontrolní skupinou pacientů bez morfinu) signifikantně snížit disperzi QT-d intervalu na elektrokardiogramu. Míra snížení QT-d je přitom přímoúměrná úspěšnosti reperfuze (Eshraghi *et al.*, 2017). Testování kombinace kardioprotektivních strategií RIPC a MPC u 96 pacientů se STEMI ukázalo, že kombinace i.v. aplikace 5 mg morfinu a RIPC navozuje, na rozdíl od samotného RIPC, signifikantní protekci před reperfuzním poškozením (Rentoukas *et al.*, 2010).

Část studií nicméně nezaznamenala negativní ani pozitivní vliv morfinu na léčbu STEMI. Gwag *et al.* (2017) se ve své klinické studii rozhodl testovat potenciální kardioprotektivní vliv morfinu. Celkem 42 pacientům se STEMI proto aplikoval těsně po reperfuzi 3 mg morfinu přímo do aorty. Výsledky však ukázaly, že při porovnání s kontrolní skupinou, nemělo podání morfinu vliv na míru poškození srdce a účinnost reperfuze. Vědecká skupina Bonin *et al.* (2018) pak provedla doposud nejrozsáhlejší studii, do které bylo zahrnuto celkem 969 pacientů se STEMI, z nichž 554 byl během PPCI podán morfin. Ze studie vyplývá, že podání morfinu není spojené s větší velikostí infarktu, vyšší úmrtností pacientů ani větším výskytem závažných nežadoucích kardiovaskulárních příhod v období 1 roku po PPCI.

3. Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo rozšířit naše vědomosti o vlivu dlouhodobého působení morfinu na srdeční tkáň potkana. Toto bádání nás později přivedlo k otázce, jaký má vliv podání morfinu na redoxní stav srdečních buněk. Z tohoto důvodu jsme se ve druhé části projektu zaměřili na zkoumání vlivu morfinu na viabilitu a redoxní stav buněčné linie potkaních kardiomyoblastů H9c2, u které byl vyvolán oxidativní stres působením *t*-BHP. Zároveň jsme se zaměřili na identifikaci signálních drah, které mají klíčovou roli v molekulárním mechanismu protektivního působení morfinu.

3.1. Přehled specifických cílů

3.1.1. Model in vivo, potkan kmene Wistar

- 1) Zkoumat důsledky 10denního podávání vysokých dávek morfinu na expresi a aktivitu AC v srdeční tkáni.
- 2) Sledovat vliv 10denní aplikace morfinu na množství a afinitu β -AR v srdeční tkáni.
- 3) Vyhodnotit vliv morfinu na expresi proteinů v srdci pomocí diferenciální 2D elektroforézy a identifikovat proteiny se změněnou expresí pomocí hmotnostní spektrometrie.
- 4) Ověřit, zda je efekt morfinu na expresní profil proteinů srdce zprostředkován aktivací OR.
- 5) Provést komplexní proteomickou analýzu vzorků potkaního srdce pomocí metody iTRAQ (izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci, isobaric tag for relative and absolute quantitation) po 10denním podávání a následném 3 nebo 6denním vysazení morfinu.

- 6) S použitím techniky imunoblotingu detekovat morfinem indukované změny v expresi proteinů za účelem potvrzení vybraných výsledků získaných pomocí proteomických přístupů.

3.1.2. Model in vitro, buněčná linie potkaních kardiomyoblastů H9c2

- 7) Zjistit, zda a za jakých podmínek může morfin v H9c2 buňkách navodit zvýšenou odolnost proti oxidativnímu stresu vyvolanému působením *t*-BHP.
- 8) Zkoumat vliv morfinu na redoxní stav buněčné linie H9c2.
- 9) Určit vliv morfinu na expresi pro-apoptotického proteinu Bax a anti-apoptotického proteinu Bcl-2.
- 10) Ověřit zapojení signálních drah p38 MAPK a PI3K/GSK-3 β do protektivního působení morfinu.

4. Seznam vlastních publikací

4.1. Seznam použitých publikací

- 1) **Skrabalova, J.**, Neckar, J., Hejnova, L., Bartonova, I., Kolar, F., Novotny, J. (2012) Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenylyl cyclase signaling in rats. *Pharmacological Reports*, 64, 351-359.
- 2) Drastichova, Z., **Skrabalova, J.**, Neckar, J., Kolar, F., Novotny, J. (2011) Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium. *Journal of Biomedical Science*, 18:89.
- 3) Drastichova, Z., **Skrabalova, J.**, Jedelsky, P., Neckar, J., Kolar, F., Novotny, J. (2012) Global changes in the rat heart proteome induced by prolonged morphine treatment and withdrawal. *PLoS One*, 7(10): e47167.
- 4) **Skrabalova, J.**, Karlovska, I., Hejnova, L., Novotny, J. (2018) Protective effect of morphine against the oxidant-induced injury in H9c2 cells. *Cardiovascular Toxicology*, 18(4), 374-385.

4.2. Seznam ostatních publikací

- 5) **Skrabalova, J.**, Drastichova, Z., Novotny, J. (2013) Morphine as a potential oxidative stress-causing agent. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 10(4), 367-372 (6).
- 6) Hejnova, L., **Skrabalova, J.**, Novotny, J. (2017) Prolonged morphine treatment alters expression and plasma membrane distribution of β -adrenergic receptors and some other components of their signaling system in rat cerebral cortex. *Journal of Molecular Neuroscience*, 63 (3-4), 364-376.

4.3. Podíl na použitých publikacích

- 1) **Skrabalova, J.**, Neckar, J., Hejnova, L., Bartonova, I., Kolar, F., Novotny, J. (2012) Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenylyl cyclase signaling in rats. *Pharmacological Reports*, 64, 351-359.
Provedla analýzu exprese a aktivity AC, saturační vazebné studie, podílela se na práci s pokusnými zvířaty, přípravě a frakcionaci tkáně, analýze dat a přípravě grafů.
- 2) Drastichova, Z., **Skrabalova, J.**, Neckar, J., Kolar, F., Novotny, J. (2011) Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium. *Journal of Biomedical Science*, 18:89.
Podílela se na práci s pokusnými zvířaty, přípravě a frakcionaci tkáně, experimentech využívajících elektroforézu a následný imunobloting, analýze dat a přípravě grafů.
- 3) Drastichova, Z., **Skrabalova, J.**, Jedelsky, P., Neckar, J., Kolar, F., Novotny, J. (2012) Global changes in the rat heart proteome induced by prolonged morphine treatment and withdrawal. *PLoS One*, 7(10): e47167.
Podílela se na práci s pokusnými zvířaty, přípravě a frakcionaci tkáně, experimentech využívajících elektroforézu a imunobloting, analýze dat, přípravě grafů a obrázku pro manuskript.
- 4) **Skrabalova, J.**, Karlovska, I., Hejnova, L., Novotny, J. (2018) Protective effect of morphine against the oxidant-induced injury in H9c2 cells. *Cardiovascular Toxicology*, 18(4), 374-385.
Provedla kultivaci buněk, standardizaci metod, podílela se na všech experimentech a analýze dat, připravila grafy a sepsala první verzi manuskriptu.

.....

Za spoluautory uvedených prací
doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

5. Seznam metod

5.1. Experimentální model in vivo

K experimentům in vivo (články č. 1, 2 a 3) byli využiti samci potkanů kmene Wistar, kterým byl i.m. podáván morfin v dávce 10 mg/kg/den po dobu 10 dnů. Kontrolním zvířatům byl po stejnou dobu i.m. podáván fyziologický roztok (0,9% NaCl). Pokusná zvířata byla usmrcena cervikální dislokací 24 h po poslední dávce morfinu. Pokud byl zároveň sledován přetrvávající vliv morfinu (článek č. 2 a 3), další skupiny pokusných zvířat byly usmrceny 3, případně 6 dnů po vysazení morfinu. Abychom ověřili, zda je sledovaný efekt morfinu zprostředkován aktivací OR, do části experimentů (článek č. 2) byly zahrnuty další dvě skupiny potkanů. Jedné z těchto skupin byl spolu s morfinem podáván i.m. naloxon v dávce 10 mg/kg/den po dobu 10 dnů, druhé skupině byl po stejnou dobu podáván pouze naloxon. V každé ze zmíněných skupin bylo vždy 10 pokusných zvířat. Ke všem experimentům byly využity levé srdeční komory, které byly homogenizovány a následně frakcionovány na cytosol, hrubé membrány, frakci obohacenou o plazmatické membrány a frakci obohacenou o mitochondrie.

5.1.2. Elektroforéza a imunobloting

V buněčných frakcích levých komor byly pomocí elektroforézy, imunoblotingu a následného značení primárními protilátkami detekovány následující proteiny: AC V/VI, HSP27, p-HSP27 (Serin 82), p-HSP27 (Serin 15), HSC70 (protein příbuzný heat shock proteinu 70, heat shock cognate 71 kDa protein), ORP150 (kyslíkem regulovaný protein, oxygen regulated protein) a GRP78 (glukózou regulovaný protein).

5.1.3. Saturační vazebné studie

Celkové množství a afinita β -AR (β_1 -a β_2 -AR) byla stanovena pomocí saturační vazebná studie s využitím radioaktivně značeného antagonisty β -AR [3 H]CGP-12177.

5.1.4. Stanovení enzymové aktivity AC

Enzymová aktivita AC byla stanovena komerčním kitem (cAMP EIA kit, NewEast Biosciences). Jedná se o imunologický enzymatický test, který využívá monoklonálních anti-cAMP protilátek. Stanovena byla A) basální aktivita AC, B) stimulovaná aktivita AC – přímou stimulací AC chloridem manganatým (MnCl_2 , 10 mM) nebo forskolinem (50 μM); stimulací $\text{G}\alpha_s$ fluoridem sodným (NaF, 10 mM) a skrze aktivaci β -AR isoprenalinem (10 μM), C) aktivita AC stimulovaná forskolinem při souběžném inhibičním působení selektivních agonistů OR – DOR [D-Ala², D-Leu⁵]-enkefalin (DADLE, 10 μM) a KOR U50488 (10 μM).

5.2. Experimentální model in vitro

K pokusům in vitro (článek č. 4) byla využita buněčná linie potkaních kardiomyoblastů H9C2. Všechny experimenty byly prováděny při 70 - 80% konfluenci buněk. Minimálně 1 h před započítáním experimentů bylo běžné živné medium (Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM obohacené 10% fetálním bovinním sérem - FBS) vyměněno za „starving“ (hladovějící) medium (DMEM obohacený 1% FBS). Buněčné kultury byly nejdříve inkubovány 15 minut s fosfátovým pufrům (PBS) obsahujícím 1 mM morfin, nebo pouze s PBS (kontrolní skupina). Následně byly buňky vystaveny oxidativnímu stresu, který byl vyvolán podáním 300 μM *t*-BHP na 15 h.

Pro počáteční testování buněčné viability a cytotoxicity byl ke kontrolní a morfinem (1 μM – 1 mM) ovlivněné skupině přidáván *t*-BHP v rozsahu 100 – 500 μM .

Potenciální zapojení signálních drah PI3K a p38 MAPK do protektivního působení morfinu bylo testováno preinkubací buněk s inhibitory PI3K - wortmanninem (1 μM), inhibitory p38 MAPK – SB 203580 (10 μM), nebo kombinací obou zmíněných inhibitorů po dobu 1 h před přidáním morfinu.

5.2.1. Testování přežívání buněk

5.2.1.1. MTT test

Buněčná viabilita byla stanovena kolorimetrickým testem 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - MTT (Mosmann, 1983). V živých – metabolicky aktivních buňkách dochází k redukci ve vodě rozpustného MTT na nerozpustný formazan, který tvoří fialové krystaly. Tyto krystaly lze rozpustit dimethylsulfoxidem a následně měřit míru zabarvení spektrofotometricky.

5.2.1.2. LDH test

Cytotoxicita byla určena pomocí detekce přítomnosti laktátdehydrogenázy (LDH) v buněčném mediu. Během buněčné smrti dochází k narušení integrity buněčné membrány a uvolňování LDH do media. Množství LDH v mediu bylo detekováno pomocí komerčního kolorimetrického testu (Cytotoxicity detection kit, Roche Applied Science).

5.2.1.3. Značení Annexin V/Hoechst 33258

Přesné procentuální zastoupení přežívající buněk bylo stanoveno průtokovou cytometrií s využitím dvojitého značení Annexin V/Hoechst 33258. Annexin V detekuje apoptotický stav buňky tím, že se váže na PS nacházející se ve vnější vrstvě plazmatické membrány. PS se běžně vyskytuje striktně ve vnitřní vrstvě membrány a do vnější vrstvy se dostává pouze během apoptózy. Hoechst 33258 se váže na DNA, ale zároveň nedokáže projít skrze neporušenou membránu. K navázání Hoechst 33258 na DNA tak dochází pouze při buněčné smrti, která je spojená se ztrátou integrity buněčné membrány. Toto značení nám umožnilo rozdělení buněčné populace na přežívající (Annexin V/Hoechst 33258 negativní), časně apoptotickou (Annexin V pozitivní/Hoechst 33258 negativní), pozdně apoptotickou (Annexin V/Hoechst 33258 pozitivní) a nekrotickou (Annexin V negativní/Hoechst 33258 pozitivní).

5.2.2. Stanovení redoxního stavu buněk

5.2.2.1. Celková antioxidační kapacita

Celková antioxidační kapacita buněk byla měřena spektrofotometricky pomocí komerčního kitu (Antioxidant assay kit, Cayman Chemical Company). Princip této kolorimetrické eseje je založen na schopnosti antioxidantů přítomných ve studovaných vzorcích zabránit oxidaci 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolin sulfonátu] - ABTS, ke kterému dochází působením metmyoglobinu.

5.2.2.2. Stanovení intracelulární hladiny ROS

Celkové intracelulární množství ROS bylo stanoveno pomocí proby 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (H₂DCF-DA). Nepochůdný H₂DCF-DA vstupuje do buňky, kde je následně působením cytosolických esteráz deacetylován na polární 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH). V přítomnosti ROS je DCFH dále oxidován za vzniku vysoce fluorescenčního dichlorodihydrofluoresceinu (DCF). V našich experimentech jsme intenzitu fluorescence měřili pomocí průtokové cytometrie.

5.2.2.3. Karbonylace proteinů

Míra oxidativního poškození proteinů - karbonylace proteinů, byla stanovena užitím 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH). DNPH reaguje s karbonylovými skupinami za vzniku stabilního dinitrofenylhydrazonu (DNP), jehož vzniklé množství lze měřit spektrofotometricky (Levine *et al.*, 1990).

5.2.2.4. Peroxidace lipidů

Peroxidace lipidů byla měřena kolorimetrickou metodou TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances). Tato metoda je založena na principu reakce produktu lipidové peroxidace - malondialdehydu (MDA) s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) za vzniku MDA-TBA konjugátu, jehož množství lze měřit spektrofotometricky.

5.2.3. Elektroforéza a imunobloting

V buněčném homogenátu byly pomocí elektroforézy, imunoblotingu a následného značení primárními protilátkami detekovány následující proteiny: Bcl-2, Bax, p38 α MAPK, p-p38 α MAPK (Threonin 180/Tyrozín 182), GSK-3 β , p-GSK-3 β (Serin 9), kataláza a SOD1.

5.3. Analýza dat

Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Data pro jednotlivé analýzy pocházejí z minimálně tří nezávislých experimentů. Výsledky byly analyzovány pomocí softwaru GraphPad 5 s využitím nepárového Studentova t-testu nebo jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA) s následným Student-Newman-Keuls testem. Statistická významnost byla určena na hladině $P < 0.05$.

6. Výsledky

6.1. Antiarytmický efekt dlouhodobého působení morfinu je u potkanů doprovázen změnami v myokardiální signalizaci adenylcyklázy

Skrabalova, J., Neckar, J., Hejnova, L., Bartonova, I., Kolar, F., Novotny, J. (2012) Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenylyl cyclase signaling in rats. *Pharmacological Reports*, 64, 351-359.

Ačkoli je morfin často využíván k tlumení bolestí, doposud neexistuje dostatečné množství informací o vlivu jeho dlouhodobého působení na myokardiální signalizaci AC, jejíž činnost hraje důležitou roli v regulaci srdečních funkcí. Cílem této studie bylo sledovat důsledky 10denního podávání vysokých dávek morfinu (10 mg/kg/den) na G-proteiny řízený signální systém AC u dospělých potkanů.

Výsledky naší studie ukázaly, že podávání morfinu neovlivnilo množství a afinitu myokardiálních β -AR ani expresi žádné z testovaných podjednotek trimerních G-proteinů ($G_s\alpha$, $G_{i/o}\alpha$, $G_z\alpha$, $G_{q/11}\alpha$ a $G\beta$). Dlouhodobé podávání morfinu ale téměř zdvojnásobilo množství dominantní myokardiální izoformy AC V/VI. Tato změna byla doprovázena výraznou supersenzibilizací AC, jejíž aktivita stimulovaná $MnCl_2$, forskolinem, NaF nebo isoprenalinem byla zvýšená o 50 – 100 %. Naopak schopnost opioidních agonistů DOR (DADLE) a KOR (U50488) inhibovat forskolinem stimulovanou aktivitu AC byla mírně, ale signifikantně snížena. Působení morfinu navíc výrazně snížilo výskyt ventrikulárních arytmií během ischemie, která byla vyvolána okluzí koronární arterie. Morfin však neměl vliv na velikost infarktu ani na výskyt arytmií během reperfuze.

Naše výsledky naznačují, že dlouhodobé podávání vysokých dávek morfinu potkanům podstatně ovlivňuje myokardiální AC signalizaci. Tyto změny jsou současně doprovázené sníženou náchylností k výskytu ventrikulárních arytmií během ischemie.

6.2. Dlouhodobé podávání morfinu mění expresi proteinů v srdeční tkáni potkanů

Drastichova, Z., **Skrabalova, J.**, Neckar, J., Kolar, F., Novotny, J. (2011) Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium. *Journal of Biomedical Science*, 18:89.

Cílem této studie bylo sledovat vliv 10denního podávání vysokých dávek morfinu (10 mg/kg/den) na změnu exprese proteinů v levé srdeční komoře dospělých potkanů.

Ve vzorcích získaných z morfinem ovlivněných jedinců bylo pomocí diferenciální 2D elektroforézy identifikováno celkem 9 proteinů s výrazně změněnou expresí. S využitím hmotnostní spektrometrií bylo následně zjištěno, že se jedná o následující proteiny: prekurzor mitochondriální aldehyddehydrogenázy 2 (ALDH2), proteinový přenašeč fosfatidylinositolu (PITP), HSP27, HSC70, ORP150, GRP78, desmin, α aktin 1 srdečního svalu a hlavní vault protein (MVP, major vault protein). Tyto proteiny plní v buňce signální, cytoprotektivní a strukturální funkci. U vybraných proteinů zapojených do cytoprotekce (HSP27, HSC70, ORP150, GRP78) byla nejdříve pomocí elektroforézy a imunoblotingu ověřena změna exprese po působení morfinu a následně byl zkoumán A) vliv přerušení podávání morfinu na expresi proteinů (použita byla srdeční tkáň z potkanů usmrcených 3 dny po poslední dávce morfinu) a B) vliv OR na indukcii změny exprese po podání morfinu. Pro tento účel byly použity další dvě skupiny potkanů. Jedné z těchto skupin byl spolu s morfinem podáván naloxon v dávce 10 mg/kg/den po dobu 10 dnů, druhé skupině byl po stejnou dobu podáván pouze naloxon. Výsledky těchto experimentů ukázaly, že u vybraných proteinů A) tři dny po přerušení podávání morfinu došlo k normalizaci hladiny exprese a B) u pokusných skupin, kterým byl zároveň s morfinem podáván naloxon, nedocházelo ke změně exprese těchto proteinů.

Tato studie ukázala, že dlouhodobé podávání vysokých dávek morfinu indukuje změnu exprese několika významných proteinů srdeční tkáně. Tato změna je patrně zprostředkována aktivací OR.

6.3. Globální změny v proteomu srdeční tkáně potkanů indukované dlouhodobým podáváním morfinu a jeho následným vysazením

Drastichova, Z., **Skrabalova, J.**, Jedelsky, P., Neckar, J., Kolar, F., Novotny, J. (2012) Global changes in the rat heart proteome induced by prolonged morphine treatment and withdrawal. *PLoS One*, 7(10): e47167

Dosavadní proteomické studie zkoumající vliv dlouhodobého podávání morfinu byly zaměřené především na studium změn v nervové tkáni, které by mohly být spojené s rozvojem tolerance a závislosti. Obdobná studie, která by se zabývala srdeční tkání, ale dosud chyběla. Cílem této studie bylo identifikovat změny proteomu v levé srdeční komoře potkanů po 10denním podávání morfinu a také po jeho následném vysazení na dobu 3 a 6 dnů.

Naše proteomická analýza provedená pomocí metody iTRAQ identifikovala 541 proteinů v cytosolu, 595 proteinů ve frakci obohacené o plazmatické membrány a 538 proteinů ve frakci obohacené o mitochondrie. Z toho celkem 237 proteinů vykazovalo změnu v expresi po podávání morfinu nebo po jeho vysazení. K nejrozsáhlejší změně v expresi (celkem 58 proteinů) došlo v cytosolu 3 dny po ukončení podávání morfinu. Analýza dále odhalila, že podávání morfinu i jeho vysazení indukuje signifikantní upregulaci v expresi heat shock proteinů (HSP27, α -B crystallin, HSP10, HSP60 a HSP70). Působení morfinu zároveň upregulovalo expresi p38 MAPK (izoformy CRA_b), která je dobře známá tím, že může fosforylovat (a aktivovat) HSP27 a α -B crystallin. Pomocí elektroforézy a následného značení specifickými protilátkami jsme navíc zjistili, že podávání morfinu zvyšuje fosforylaci HSP27, míra fosforylace byla přitom nejvyšší 3 dny po ukončení podávání morfinu a 6. den se navracela na kontrolní hladinu. Žádné změny nebyly naopak pozorovány v expresi proteinů, které jsou zapojeny do regulace oxidativního stresu a jen několik změn bylo odhaleno v hladině pro- a anti-apoptotických proteinů.

Získaná data poskytují komplexní pohled na změny v proteomu srdce po působení morfinu a zároveň demonstrují, jak vysokou senzitivitu má srdeční tkáň k morfinu.

6.4. Morfin navozuje protekci proti oxidativnímu stresu v buněčné linii potkaních kardiomyoblastů H9c2

Skrabalova, J., Karlovska, I., Hejnova, L., Novotny, J. (2018) Protective effect of morphine against the oxidant-induced injury in H9c2 cells, *Cardiovascular Toxicology*. *Cardiovascular Toxicology*. 18(4), 374-385.

Studie posledních let ukázaly, že podávání morfinu může chránit srdeční tkáň před I-R poškozením. Zásadním faktorem podílejícím se na vzniku I-R poškození je přitom extensivní produkce ROS. Cílem tohoto projektu bylo sledovat vliv 1 mM morfinu na viabilitu a redoxní stav potkaních kardiomyoblastů H9c2 po indukci oxidativního stresu vlivem 300 μ M *t*-BHP.

Působení *t*-BHP (15 h) snížilo počet přežívajících buněk na 3 %. Preinkubace s morfinem (15 min) působila výrazně protektivně, když dokázala zvýšit viabilitu buněk o 72 %. Morfin zároveň zvýšil celkovou antioxidační kapacitu buněk a snížil karboxylaci proteinů, peroxidaci lipidů a celkové množství ROS. Preinkubace s morfinem pak snížila negativní dopad *t*-BHP na všechny výše popsány parametry redoxního stavu buněk. Oxidativní poškození buněk způsobené *t*-BHP bylo doprovázeno sníženým poměrem anti-apoptického proteinu Bcl-2/pro-apoptického proteinu Bax, p-p38/p38 MAPK a p-GSK-3 β /GSK-3 β . Preinkubace s morfinem zcela blokovala negativní efekt *t*-BHP a zvýšila poměr Bcl-2/Bax, p-p38/p38 MAPK a p-GSK-3 β /GSK-3 β ke kontrolní hladině. Působení morfinu navíc zvýšilo expresi katalázy a nemělo vliv na expresi SOD1. Protektivní působení morfinu bylo částečně blokováno inhibitorem p38 MAPK SB 203580 (snížení viability o 21 %) a inhibitorem PI3K wortmanninem (snížení viability o 32 %). Kombinace obou inhibitorů snižovala protektivní vliv morfinu o 50 %.

Výsledky naší studie ukazují, že preinkubace s morfinem dokáže významně ochránit H9c2 buňky před oxidativním stresem vyvolaným působením *t*-BHP. Toto cytoprotektivní působení je alespoň z části přenášeno signálními drahami p38 MAPK a PI3K/GSK-3 β .

7. Diskuze

Vliv dlouhodobého působení morfinu byl v souvislosti se snahou o objasnění vzniku tolerance a závislosti zkoumán především v nervové tkáni. Srdeční tkáň se dostalo větší pozornosti až po zjištění, že podání morfinu před infarktem myokardu dokáže u potkanů signifikantně snížit I-R poškození (Schultz *et al.*, 1996). Většina dosavadních studií je však zaměřená pouze na zkoumání akutního působení morfinu a jeho potenciální schopnosti vyvolávat kardioprotekci. Existuje tak jen poměrně málo informací o důsledcích dlouhodobého podávání morfinu na srdeční tkáň. Z tohoto důvodu bylo prvním cílem projektu rozšířit naše vědomosti o vlivu dlouhodobého působení morfinu na srdeční tkáň potkana. Blíže jsme se zaměřili na zkoumání důsledků 10denního podávání vysokých dávek morfinu na AC a β -AR v srdeční tkáni. Dále jsme provedli proteomickou analýzu vzorků získaných ze srdce potkana po 10denním podávání morfinu a také po jeho následném vysazení na dobu 3 a 6 dnů.

Výsledky naší studie ukázaly, že 10denní podávání morfinu nemá vliv na celkové množství a afinitu myokardiálních β -AR a ani na expresi žádné z testovaných podjednotek trimerních G-proteinů ($G_s\alpha$, $G_{i/o}\alpha$, $G_z\alpha$, $G_{q/11}\alpha$ a $G\beta$). Dlouhodobé podávání morfinu ale téměř zdvojnásobilo množství dominantní myokardiální izoformy AC V/VI. Tato změna byla doprovázena výraznou supersenzibilizací AC, jejíž aktivita stimulovaná $MnCl_2$, forskolinem, NaF nebo isoprenalinem byla zvýšená o 50 – 100 %. Naopak schopnost opioidních agonistů DOR (DADLE) a KOR (U50488) inhibovat forskolinem stimulovanou aktivitu AC byla mírně, ale signifikantně snížena.

β -AR patří stejně jako OR do rodiny GPCR. β -AR, ale na rozdíl od OR vážou podjednotku $G\alpha_s$, která stimuluje AC. V srdeční tkáni se nachází především β_1 -AR a β_2 -AR, přičemž dominantní je podtyp β_1 -AR, který tvoří až 80 % všech β -AR (Rockman *et al.*, 2002). Během aktivace nervových vláken sympatiku se z nervových zakončení uvolňují spolu s agonistou β -AR noradrenalinem i enkefaliny (Wilson *et al.*, 1980), čímž dochází k funkčnímu propojení signálního systému opioidní a adrenergní signalizace. V kardiomyocytech toto propojení slouží jako důležitý regulační prvek β -AR signalizace, když enkefaliny, skrze inhibici AC, regulují metabolismus Ca^{2+} a s ním spojenou kontraktilitu srdce (Pepe *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1997). Mezi OR a β -AR tak

dochází k funkčnímu cross-talku, o čemž svědčí i fakt, že dlouhodobé působením morfinu vyvolává u myši kardioprotektivní efekt, na kterém se podílí právě aktivace β_2 -AR a G_{α_s} (Peart a Gross, 2006). Zároveň lze předpokládat, že při aktivaci OR exogenním agonistou morfinem, dochází k narušení rovnováhy mezi signálním systémem opioidních a adrenergických receptorů, na které buňka musí reagovat adaptačními mechanismy. To ukazuje například studie Kindman *et al.*, (1991), která uvádí, že působení morfinu zvyšuje kontraktilní odpověď srdeční tkáně na stimulaci β -AR isoprenalinem. Některé studie přitom popisují, že dlouhodobé podávání morfinu vede ke zvýšení počtu β -AR v mozkové kůře potkana (Hejnova, *et al.*, 2017) nebo v buněčné linii A431 stabilně exprimující MOR (Ammer a Schulz, 1997). Různé tkáně ale mohou pravděpodobně reagovat na dlouhodobé působení morfinu odlišně, protože zatímco v mozku potkana dochází ke zvýšení počtu β -AR, v plicích ani srdci ke změně nedochází (Kuriyama *et al.*, 1981). Naše výsledky jsou v souladu s tímto pozorováním a můžeme tak usuzovat, že se srdeční tkáň vyrovnává s dlouhodobou aktivací OR jiným mechanismem.

Jednou z těchto adaptací by mohla být supersenzibilizace AC, kterou jsme pozorovali v našich experimentech. Zatímco akutní působení opioidů je spojené především s inhibicí AC, dlouhodobá aktivace OR může vést naopak k upregulaci AC. Tento fenomén se nazývá heterologní senzibilizace. Obecně se popisuje, že při akutní aktivaci podjednotek $G_{\alpha_{i/o}}$ a $G_{\beta\gamma}$ dochází k inhibici AC I, V, VI a VIII a stimulaci AC II, IV a VII. Dlouhodobá aktivace OR naopak způsobuje superaktivaci AC I, V, VI a VIII a superinhibici AC II, IV a VII (Schallmach *et al.*, 2006). Tento jev byl dříve spojován s rozvojem tolerance a závislosti (Sharma *et al.*, 1975). Později se ale ukázalo, že ačkoli chronické působení morfinu indukuje u β -arrestin-knockout myši superaktivaci AC ve striatu, nedochází u těchto zvířat k rozvoji tolerance, ale pouze závislosti (Bohn *et al.*, 2000). Heterologní senzibilizace AC indukovaná chronickým působením morfinu byla popsána především na modelu buněčných linií (Avidor-Reiss *et al.*, 1996; Ammer a Schulz, 1997; Schallmach *et al.*, 2006) a v některých regionech mozku (Duman *et al.*, 1988; Bohn *et al.*, 2000; Hejnova *et al.*, 2017). Vliv chronického podávání morfinu na aktivitu AC v srdeční tkáni byl doposud zkoumán pouze v jedné studii provedené na psím modelu. Výsledky této studie nicméně ukázaly, že dlouhodobá aplikace morfinu v dávce 5,75 mg/kg nezpůsobuje oproti kontrolám rozdíl v aktivitě AC (Napier *et al.*, 1999). Rozdílné výsledky této studie ve srovnání s naším pozorováním mohou být způsobeny

například tím, že Napier *et al.*, (1999) ve své studii použil nižší dávky morfinu nebo jiné experimentální uspořádání, když mezi poslední dávkou morfinu a usmrčením pokusných zvířat byla pravděpodobně kratší prodleva než 24 h. Odlišné výsledky pozorování mohou být způsobené také rozdílně zvoleným animalním modelem. Například ve studii Bohn *et al.* (2000) vedlo dlouhodobé podávání morfinu k superaktivaci AC ve striatu u myši, zatímco ve studii Duman *et al.* (1988), která byla provedena na potkanech, způsobilo dlouhodobé podávání morfinu zvýšení aktivity AC v locus coeruleus, ale nikoli ve striatu.

Z našich experimentů vyplývá, že přímá stimulace AC po dlouhodobém působení morfinu zvyšuje aktivitu tohoto enzymu přibližně o 70 %, zatímco nepřímá stimulace skrze aktivaci β -AR a $G\alpha_s$ zvyšuje aktivitu AC v průměru o 90 %. Naopak schopnost opioidních agonistů inhibovat forskolinem stimulovanou aktivitu AC je mírně, avšak signifikantně snížena. Částečně lze supersenzibilizaci AC a sníženou schopnost inhibovat forskolinem stimulovanou enzymovou aktivitu AC vysvětlit výrazně zvýšenou expresí AC V/VI, kterou jsme pozorovali po 10denním podávání morfinu. V srdeční tkáni savců můžeme detekovat čtyři izoformy AC (IV-VII), přičemž právě AC V a VI jsou považovány za dominantní (Iyengar, 1993; Espinasse *et al.*, 1995). Je však zřejmé, že za supersenzibilizaci AC stojí i další adaptační mechanismy posilující signalizaci spojenou s $G\alpha_s$ proteiny. Dosavadní studie spojují heterologní senzibilizaci AC, ke které dochází po dlouhodobém podávání morfinu, se zvýšenou expresí β_2 -AR (Ammer a Schulz, 1997; Hejnova *et al.*, 2017) a aktivací $G\alpha_{i/o}$ a $G\beta\gamma$ (Avidor-Reiss *et al.*, 1996), MAPKKK Raf-1 signální kaskády ERK (Yue *et al.*, 2006) a PKC (Schallmach *et al.*, 2006). Zároveň za superaktivaci AC není zodpovědné prvotní snížení hladiny cAMP spojené s akutním působením morfinu (Steiner *et al.*, 2005) a nelze tak tento fenomén přičíst downregulaci signální dráhy PKA/CREB, která je zodpovědná za změny v buněčné transkripci (Mayr a Montminy, 2001). Jelikož v našich experimentech nedocházelo ke změně exprese β_2 -AR ani žádné z testovaných podjednotek trimerních G-proteinů ($G_s\alpha$, $G_{i/o}\alpha$, $G_z\alpha$, $G_{q/11}\alpha$ a $G\beta$), můžeme předpokládat, že podíl na supersenzibilizaci AC mají spíše molekuly nacházející se v signální hierarchii (downstream) pod G-proteiny.

Pro zajímavost je možné doplnit, že 10denní působení morfinu v dávce 10 mg/kg/den dokázalo výrazně snížit incidenci ventrikulárních arytmií během ischemie, která byla vyvolána okluzí vzestupné koronární arterie. Působení morfinu ale nedokázalo

snížit velikost infarktu ani incidenci arytmií během reperfuze. Naprostá většina dosavadních publikací zabývajících se kardioprotektivními vlastnostmi morfinu je zaměřená pouze na efekt jeho akutního podání. Existuje však i několik studií, které porovnávají protektivní působení akutního a chronického podávání morfinu. Chronický morfinový preconditioning byl v těchto studiích navozen 3týdenním podáváním morfinu v pitné vodě potkanům – přibližně 20 mg/den (Chan *et al.*, 1987) nebo 5denní implantací 75mg morfinové pelety myším (Peart a Gross, 2004a, 2004b, 2006; Peart *et al.*, 2011). Všechny uvedené studie shodně popisují, že chronické podávání morfinu dokáže navodit výraznější protekci před I-R poškozením než akutní podání morfinu. Současné posmrtná analýza autopsií získaných od 98 dlouhodobých uživatelů opiátů a 97 kontrolních subjektů ukázala, že chronické působení opiátů může snížit závažnost ICHS a jejich fatálních následků (Marmor *et al.*, 2004). Pro vyvolání akutního kardioprotektivního efektu MPC je dostatečná jednorázová aplikace 0,3 mg/kg morfinu (Schultz *et al.*, 1996). V našich experimentech jsme potkanům podávali poměrně vysoké dávky morfinu 10 mg/kg/den (10 dní). Nicméně z porovnání s výše popsány mi studiemi plyne, že dávky morfinu, které spolehlivě navozují výrazný kardioprotektivní fenotyp při ChMPC, jsou podstatně vyšší, než dávky morfinu použité v naší studii.

V dalších dvou studiích jsme se zaměřili na zkoumání vlivu morfinu na změnu proteomu v levé srdeční komoře potkana. Využili jsme stejné experimentální uspořádání jako v předchozí studii, kdy byl morfin v dávce 10 mg/kg podáván po dobu 10 dní. Zároveň jsme sledovali vliv 3. nebo 6denního vysazení morfinu na expresi proteinů. Vzorky srdeční tkáně jsme homogenizovali a následně frakcionovali na cytosol, frakci obohacenou o plazmatické membrány a frakci obohacenou o mitochondrie. Jednotlivé frakce jsme poté analyzovali s využitím následujících proteomických přístupů: diferenciální 2D elektroforéza, iTRAQ a elektroforéza s imunoblotingem.

Pomocí diferenciální 2D elektroforézy jsme identifikovali celkem 9 proteinů se změněnou expresí po působení morfinu. Hmotnostní spektrometrie odhalila, že se jedná o následující proteiny: ALDH2, P1TP, HSP27, HSC70, ORP150, GRP78, desmin, α aktin 1 srdečního svalu a MVP. Tyto proteiny plní v buňce signální, cytoprotektivní a strukturální funkce. Ke snížení exprese po působení morfinu došlo pouze u ALDH2, hladina ostatních proteinů byla upregulována. K nejvýraznější změně došlo ve frakci obohacené o plazmatické membrány, kde jsme detekovali celkem 6 proteinů se změněnou

expresí (HSC70, ORP150, GRP78, desmin, α aktin 1 srdečního svalu a MVP), v cytosolické frakci došlo ke změně exprese u tří proteinů (ALDH2, P1TP, HSP27) a žádná změna nebyla detekována ve frakci obohacené o mitochondrie.

P1TP usnadňuje transport fosfolipidů a fosfatidylinositolu mezi buněčnými membránami. P1PT se tak podílí na lipidovém transportu, ale také na signalizaci PLC a PI3K (Cockcroft a Garner, 2011). MVP je součástí ribonukleoproteinového komplexu vault. Jeho činnost je spojována především s rezistencí proti xenobiotikům a různým druhům buněčného stresu. Zároveň při hyperosmotickém stresu dochází působením p38 MAPK k indukci exprese MVP. Zvýšená hladina MVP poté navozuje cytoprotekci, do které je zapojena signální dráha PI3K/Akt (Ikeda *et al.*, 2008). Dlouhodobé působení morfinu tak teoreticky může skrze indukci zvýšené exprese P1PT a MVP upregulovat signalizaci PI3K. Aktivace PI3K přitom hraje důležitou roli ve zprostředkování kardioprotektivního působení akutního (Gross *et al.*, 2004) i chronického (Peart *et al.*, 2011) morfinového preconditioningu.

Desmin je součástí cytoskeletu a má podstatnou roli v udržování strukturální a funkční integrity myocytů. Jeho absence vede k hypertrofii a dilataci tkáně. Exprese desminu je často zvýšená u různých srdečních chorob. Zároveň srdce reaguje zvýšenou expresí desminu na stres, který je na srdce vyvíjen – například při chronickém působení vysokého krevního tlaku, který vede k hypertrofii a selhání srdce. Zatímco porucha funkčnosti desminu vede k remodelaci srdce a následnému poškození jeho funkce, nadměrná exprese není pro srdeční tkáň škodlivá (Wang *et al.*, 2002). Strukturální protein α aktin 1 srdečního svalu se podílí na kontraktilní funkci myocytů. Jeho mutace jsou spojeny například s vrozenými defekty síňového septa (Matsson *et al.*, 2008). Degradace desminu může být pravděpodobně spojená také se zhoršením I-R poškození myocytů (Blunt *et al.*, 2007). Lze tak spekulovat, že působení morfinu skrze upregulaci strukturálních proteinů myofibril desminu a α aktinu poskytuje srdeční tkáni vyšší odolnost proti případné ischemii nebo jiné stresové události.

ALDH je důležitý enzym, který katalyzuje oxidaci reaktivních aldehydů na nereaktivní kyseliny. Reaktivní aldehydy vznikají v důsledku působení oxidativního stresu a svojí činností poškozují buněčné struktury a přispívají k rozvoji srdečních chorob (Chen *et al.*, 2010). Aktivita ALDH2 může také ochraňovat srdeční tkáň před I-R poškozením (Ma *et al.*, 2011). Dlouhodobé podávání morfinu mělo v naší studii negativní

efekt na expresi ALDH2. Morfin tedy pravděpodobně v tomto ohledu snížil schopnost kardiomyocytů odolávat negativním vlivům ischemie.

ORP150 a GRP78 patří mezi molekulární chaperony – „gardedámy“ pro proteiny. Chaperony mají v buňce důležitou cytoprotektivní roli, jelikož napomáhají skládat nově syntetizované proteiny do patřičné konformace, která je nezbytná pro jejich správnou funkci. Během stresových podmínek v buňce dochází ke zvýšení počtu nesložených nebo špatně složených proteinů. Buňka na tento stav reaguje zvýšenou expresí molekulárních chaperonů (Yu *et al.*, 1999; Cechowska-Pasko *et al.*, 2006). Velkou podskupinou molekulárních chaperonů jsou heat shock proteiny, mezi které patří i HSP27 a HSC70. HSP působí protektivně, když zabráňují agregaci proteinů a zároveň usnadňují jejich opětovnému složení do správné konformace. Jejich hladina prudce stoupá během stresových podmínek a HSP tak pomáhají buňce udržovat homeostázu i v nepříznivých podmínkách (Kim *et al.*, 2006).

U vybraných proteinů zapojených do cytoprotekce – molekulárních chaperonů (HSP27, HSC70, ORP150, GRP78) jsme zároveň ověřili změnu exprese po působení morfinu pomocí elektroforézy a imunoblotingu. Pomocí stejné experimentální techniky jsme následně na skupině potkanů, kteří byli usmrceni 3 dny po poslední dávce morfinu, zkoumali vliv přerušení podávání morfinu na expresi vybraných proteinů. Naše výsledky ukázaly, že 3 dny po ukončení podávání morfinu hladina exprese těchto proteinů klesla zpět ke kontrolní úrovni.

V doplňujících experimentech jsme zároveň zkoumali vliv OR na indukci změny exprese vybraných cytoprotektivních proteinů po podání morfinu. Pro tento účel byly použity další dvě skupiny potkanů. Jedné z těchto skupin byl spolu s morfinem podáván specifický antagonist OR naloxon v dávce 10 mg/kg/den po dobu 10 dnů, druhé skupině byl po stejnou dobu podáván pouze naloxon. Podávání naloxonu nezměnilo expresi sledovaných proteinů, ale zrušilo efekt dlouhodobého podávání morfinu na zvýšenou expresi molekulárních chaperonů. Z našich výsledků tedy jasně vyplývá, že změna v expresi molekulárních chaperonů byla zprostředkována aktivací OR.

Morfin je v těle konvertován z 55 % na M3G a z 10 % na M6G. Jen přibližně 3 – 8 % morfinu zůstává nekonvertováno až do svého vyloučení z těla (Hasselström a Säwe, 1993). Zatímco morfin i M6G aktivují OR (De Gregori *et al.*, 2012), M3G

vykazuje k OR jen nízkou afinitu (Lötsch *et al.*, 1996), ale může stejně jako morfin aktivovat také TLR4 (Xie *et al.*, 2017). Ačkoli není zcela jasné v jaké míře, a jestli vůbec, jsou TLR4 exprimovány ve zdravé srdeční tkáni dospělých jedinců, aktivace těchto receptorů může být úzce zapojena do patofyziologie nejrozličnějších kardiovaskulárních chorob (Mann, 2011). Stimulace TLR navíc vede k regulaci buněčné transkripce (Akira a Takeda, 2004). Doposud však nebyla vypracována studie, která by se zabývala vlivem morfinu nebo M3G na aktivaci TLR4 ve vztahu působení na srdeční tkáň. Přestože z našich výsledků jasně vyplývá, že změny v expresi molekulárních chaperonů po podávání morfinu byly zprostředkovány OR, důsledky případné aktivace TLR4 po podávání morfinu představují zajímavou oblast studia pro budoucnost.

Pro druhou studii zaměřenou na zkoumání změny proteomu srdeční tkáně potkana po 10denním podávání a následném 3 nebo 6denním vysazení morfinu, jsme využili metodu iTRAQ. Touto komplexní analýzou se nám podařilo identifikovat 541 proteinů v cytosolu, 595 proteinů ve frakci obohacené o plazmatické membrány a 538 proteinů ve frakci obohacené o mitochondrie. Z toho celkem 237 proteinů vykazovalo změnu v expresi po podávání morfinu nebo po jeho vysazení. Zatímco 10denní podávání morfinu změnilo expresi 72 proteinů, 3 dny po vysazení morfinu byla exprese změněná u 105 proteinů a 6 dní po vysazení u 60 proteinů. K nejrozsáhlejší změně v expresi (celkem 58 proteinů) došlo v cytosolu 3 dny po ukončení podávání morfinu.

V naší předchozí studii se zvýšená hladina exprese molekulárních chaperonů HSP27, HSC70, ORP150, GRP78 navracela ke kontrolní hladině již tři dny po ukončení podávání morfinu. Nicméně, jak je patrné z rozsáhlejší studie využívající techniku iTRAQ, 3 dny po vysazení morfinu se změny v proteomu srdeční tkáně ještě zvyšují a přetrvávají i 6 dní po ukončení podávání morfinu. Podobný přetrvávající efekt po dlouhodobém působení morfinu byl zaznamenán i ve studii Peart *et al.* (2011), ve které byl sledován vliv ChMPC na myších, kterým byla na 5 dní podkožně implantována 75mg morfinová peleta. Výsledky této studie ukázaly, že chronické působení morfinu dokázalo ochránit srdeční tkáň myši před I-R poškozením až 7 dní po odebrání morfinové pelety.

S pomocí analýzy iTRAQ jsme dále odhalili, že podávání morfinu i jeho vysazení indukuje signifikantní upregulaci v expresi heat-shock proteinů (HSP27, α -B crystallinu, HSP10, HSP60 a HSP70). Působení morfinu zároveň upregulovalo expresi p38 MAPK (izoformy CRA_b), která je dobře známá tím, že může fosforylovat (a aktivovat) HSP27

a α -B crystallin (Blunt *et al.*, 2007; Aggeli *et al.*, 2008). Pomocí elektroforézy a následného značení specifickými protilátkami jsme navíc ověřili, že podávání morfinu zvyšuje fosforylaci HSP27. Míra fosforylace přitom byla nejvyšší 3 dny po ukončení podávání morfinu a šestý den se vrátila na kontrolní hladinu. Žádné změny nebyly pozorovány v expresi proteinů, které jsou zapojeny do regulace oxidativního stresu a jen několik změn bylo odhaleno v hladině pro- a anti-apoptotických proteinů.

Ashton *et al.*, (2013) provedl proteomickou analýzu levé srdeční komory myší po chronickém působení morfinu. Využil přitom model, kdy je myším implantována 75mg morfinová peleta na 5 dní, tedy model ChMPC, který bezpečně navozuje proteci před I-R poškozením. Výsledky této studie ukázaly, že podobně jako v našich analýzách, nedošlo ke změně exprese proteinů, které „běžně“ zprostředkovávají protekci. Současně, podobně jako v našich analýzách, docházelo k upregulaci některých kontraktilních proteinů sarkomery, včetně desminu. ChMPC u myší byl ale spojen s upregulací exprese natriuretických peptidů a výraznou represí exprese imunitních a prozánětlivých mediátorů, proteinů indukovaných stresem ER (včetně HSP40) a proteinů zapojených do regulace transkripce. Systém nespecifické imunity je úzce zapojen do patogeneze kardiovaskulárních chorob (Mann, 2011). Zároveň přílišná aktivita imunitního systému vedoucí k aktivaci neutrofilů během reperfuze výrazně přispívá k dalšímu poškození a odumírání tkáně myokardu (Hausenloy a Yellon, 2013). Je proto možné, že právě výrazná represe exprese imunitních a prozánětlivých mediátorů, ke které docházelo ve studii Ashton *et al.*, (2013), dokázala napomoci k navození výrazného kardioprotektivního fenotypu při ChMPC.

Zvýšená exprese HSP10, HSP60 (Lin *et al.*, 2001), HSP 70 (Radford *et al.*, 1996), α -B crystallinu (Ray *et al.*, 2001) a HSP27 (Vander Heide, 2002) je spojená s vyšší rezistencí kardiomyocytů vůči I-R poškození. Cytoprotektivní působení HSP27 je spojováno především s jeho schopností stabilizovat aktin (Peart *et al.*, 2007). Zároveň Blunt *et al.* (2007) ve své studii popisuje, že po aktivaci signální dráhy p38MAPK/HSP27 dochází k translokaci fosforylovaného HSP27 do myofibril, kde zabraňuje škodlivému působení proteázy calpainu, která degraduje myokardiální proteiny jako je například desmin, čímž přispívá k dysfunkci myocytů a následné buněčné smrti. K aktivaci calpainu dochází během ischemie a reperfuze v důsledku buněčného přetížení vysokou koncentrací Ca^{2+} (Blunt *et al.*, 2007). Ačkoli 10denní působení morfinu v dávce 10 mg/kg/den zvyšuje

expresi HSP, které mohou mít výraznou cytoprotektivní funkci, navozený kardioprotektivní fenotyp byl v našich experimentech dostatečný pouze pro snížení incidence ventrikulárních arytmií během ischemie, která byla vyvolána okluzí koronární arterie, ale již nedokázal snížit velikost infarktu ani incidenci arytmií během reperfuze.

Princip IPC spočívá v navození několika krátkých ischemických period v koronárních tepnách, které ale nejsou natolik závažné, aby způsobily poškození srdeční tkáně. Zároveň platí, že pokud je po IPC navozena dlouhodobá ischemie, dochází k signifikantnímu snížení I-R poškození (Murry *et al.*, 1986). Princip preconditioningu tedy spočívá v navození stresových podmínek, které nejsou natolik závažné, aby kardiomyocyty poškodily, ale jsou dostatečné pro spuštění protektivních mechanismů. Při následném vystavení ischemii jsou tak kardiomyocyty připraveny odolávat stresu a mají větší šanci stresové podmínky překonat. Jelikož dlouhodobé působení morfinu může zvyšovat oxidativní stres v buňce (Payabvash *et al.*, 2006) a současně oxidativní stres může zvyšovat expresi HSP (Bernardini *et al.*, 2004; Abruzzo *et al.*, 2010) a aktivitu p38 MAPK (Blunt *et al.*, 2007), dalo by se předpokládat, že 10denní podávání morfinu vedlo právě ke zvýšení oxidativního stresu, který následně indukoval zvýšenou expresi molekulárních chaperonů. Proteomická analýza iTRAQ nicméně ukázala, že 10denní podávání morfinu nemělo vliv na expresi enzymů, které se podílejí na regulaci redoxního stavu buňky (SOD1, SOD2, glutathion peroxidázy (GSHPx), prekursoru izoformy GSHPx4, peroxiredoxinu (Prx 2), Prx 3, Prx 5, Prx 6 ani katalázy). Jedním z ukazatelů oxidativního působení morfinu přitom může být právě snížená hladina nebo aktivita enzymů antioxidačního systému buňky, například SOD, GSHPx, katalázy nebo glutathionu (Sumathi *et al.*, 2011).

Výsledky našich proteomických studií nás přivedly k otázce, jaký vliv má působení morfinu na redoxní stav srdečních buněk. Z tohoto důvodu jsme se ve druhé části projektu zaměřili na zkoumání vlivu 1 mM morfinu na viabilitu a redoxní stav buněčné linie potkaních kardiomyoblastů H9c2, u které byl vyvolán oxidativní stres působením 300 μ M *t*-BHP. Současně jsme se zaměřili na identifikaci signálních drah, které mají klíčovou roli v molekulárním mechanismu protektivního působení morfinu.

Sardão *et al.* (2007) ve své studii zjistil, že působení *t*-BHP zvyšuje intracelulární oxidativní stres a indukuje apoptózu a nakrózu buněčné linie H9c2. Naše experimenty toto pozorování potvrdily, když podávání zvyšujících se koncentrací *t*-BHP (100 μ M –

500 μM) vyvolalo přímo úměrné snížení viability H9c2. Zatímco samostatné podávání 1 mM morfinu nemělo žádný vliv na viabilitu H9c2, akutní (15 min) preinkubace s morfinem dokázala významně snížit negativní vliv každé z testovaných koncentrací *t*-BHP. Pro další experimenty jsme vybrali 300 μM koncentraci *t*-BHP, která po 15 h stabilně snižovala počet přežívajících buněk na 3 %. Preinkubace s morfinem přitom dokázala zvýšit viabilitu buněk o 72 %. Morfin zároveň vykazoval silné antioxidační vlastnosti, když zvýšil celkovou antioxidační kapacitu buněk a snížil karbonylaci proteinů, peroxidaci lipidů a celkové množství ROS. Preinkubace s morfinem pak výrazně snížila negativní dopad *t*-BHP na všechny výše popsané parametry redoxního stavu buněk.

Cunha-Oliviera *et al.* (2013) zaznamenal podobné antioxidační působení 1 mM morfinu na mitochondriích izolovaných z potkaních jaterních buněk. Na základě studie, ve které Grünblatt *et al.* (2008) popisuje antioxidační vlastnosti molekuly apomorfinu, Cunha-Oliviera *et al.* (2013) předpokládá, že antioxidační efekt morfinu lze připsat právě jeho chemické struktuře. Morfin má totiž podobně jako apomorfin benzenový kruh s hydroxylovou skupinou, která má schopnost přijímat elektron, čímž dokáže zabránit redukci O_2 vedoucí ke generaci volných radikálů. Tuto teorii potvrzuje i skutečnost, že heroin, který nemá benzenový kruh, nevykazuje na rozdíl od morfinu žádnou antioxidační kapacitu (Cunha-Oliveira *et al.*, 2013). Antioxidační vlastnosti molekuly morfinu byly nedávno potvrzeny také ve studii Borges *et al.* (2016).

V prvotních experimentech jsme testovali rozdílné koncentrace morfinu v rozmezí 1 mM – 1 μM a jejich schopnost navodit protektivní působení před oxidativním poškozením, které bylo vyvoláno působením *t*-BHP. Naše výsledky ukázaly, že míra cytoprotektivního efektu morfinu pozitivně korelovala se zvyšující se dávkou morfinu. Pozitivní závislost cytoprotektivního efektu na zvyšující dávce morfinu byla pozorována i v dalších *in vitro* studiích (Gülçin, 2004; Almeida *et al.*, 2014; Costa-Malaquias *et al.*, 2014) a pravděpodobně může být spojena právě s antioxidačními vlastnostmi molekuly morfinu.

Výrazné cytoprotektivní účinky jsme zaznamenali především při podávání vysokých (1 mM) dávek morfinu. Jelikož některé studie popisují, že podávání vysokých dávek morfinu může vyvolávat oxidativní stres a apoptózu (Hatsukari *et al.*, 2007; Eslami a Sharifi, 2014), mohou se naše výsledky jevit velmi překvapivě. Nicméně jak je patrné

z dřívějších studií, rozhodně nejsou výjimkou. Ve studii Hargrave *et al.* (2003) žádná z testovaných koncentrací morfinu v rozmezí 1 μ M - 1 mM a dokonce ani o jeden řád vyšší dávka – v koncentraci 10 mM, neindukovala produkci ROS v buněčné linii H9c2. Cunha-Oliveira *et al.* (2013) pak ve své práci popisuje, že působení 1 mM morfinu nemělo vliv na většinu respiračních parametrů mitochondrií izolovaných z potkaních jaterních buněk. Působení 1 mM morfinu, ale snížilo peroxidaci lipidů a produkci H₂O₂ a zabránilo negativnímu dopadu, který na tyto parametry mělo podávání kokainu.

Studie, které se zabývají vlivem morfinu na redoxní stav buněk, jsou poměrně rozporuplné a jejich výsledky vždy závisí na mnoha faktorech, jako je věk, typ tkáně/buněčné linie, velikost dávky a délka působení. Z tohoto důvodu nemůže být morfin jednoduše označen jako látka, která snižuje/zvyšuje oxidativní stress (Skrabalova *et al.*, 2013). Navzdory výraznému protektivnímu efektu, který mělo podávání 1 mM morfinu v našich experimentech, nemůže být vyloučeno, že při podávání stejných dávek jiné buněčné linie nebo in vivo, by morfin mohl vykazovat spíše škodlivé účinky. Zároveň je třeba si uvědomit, že zatímco v in vitro podmínkách vyvolává efekt pouze morfin, v in vivo experimentech je morfin po aplikaci poměrně rychle metabolizován na M3G a M6G. Z velké části je přitom morfin metabolizován na M3G (Hasselström a Säwe, 1993), který má velmi nízkou afinitu k OR a jehož působení může být spojeno se vznikem neurotoxických syndromů (Andersen *et al.*, 2003). Je však také možné, že srdeční tkáň snáší působení opioidů lépe než jiné tkáně. Například působení derivátu morfinu - heroinu zvýšilo produkci ROS a s ním spojené oxidativní poškození proteinů a lipidů v mozku a játrech, ale nemělo vliv na redoxní stav srdečních buněk (Pan *et al.*, 2005). Tuto představu potvrzují i výsledky naší proteomické studie, které nezaznamenaly žádné výrazné změny v expresi antioxidantních enzymů (SOD1, SOD2, GSHPx, Prx a katalázy) po 10denním působení morfinu v levé srdeční komoře potkanů, ačkoli v jiných studiích dlouhodobé působení morfinu snížilo expresi a aktivitu SOD1, SOD2 a glutathionu v potkaním mozku (Bierczynska-Krzysik *et al.*, 2006; Sumathi *et al.*, 2011) a glutathionu v myších játrech (Payabvash *et al.*, 2006). Nicméně nedávná studie Arabian *et al.* (2017) ukázala, že chronické působení morfinu v buněčné kultuře hipokampálních neuronů CA1 naopak zvýšilo aktivitu katalázy. Z našich experimentů zároveň vyplývá, že působení morfinu v buněčné linii H9c2 zvyšuje expresi katalázy a nemá vliv na expresi SOD1.

Tato data tak potvrzují fakt, že vliv morfinu na redoxní stav buněk je silně závislý na konkrétní tkáni a dalších experimentálních podmínkách.

Několik recentních studií popisuje, že působení morfinu v terapeutické (1 μ M) koncentraci, která se běžně využívá k navození analgezie, přispívá ke snížení oxidativního stresu a zvyšuje viabilitu buněk C6 odvozených z potkaního gliomu (Almeida *et al.*, 2014; Costa-Malaquias *et al.*, 2014), H9c2 (Amini-Khoei *et al.*, 2016), myších kardiomyoblastů HL-1 a primárních potkaních kardiomyoblastů (He, H. *et al.*, 2016). Buněčné poškození, které bylo ve všech těchto experimentech vyvoláno oxidativním stresem, bylo ale mnohem nižší než v našich experimentech, kdy působení *t*-BHP (300 μ M, 15 h) snižovalo počet přežívajících buněk až o 97 %. Z tohoto důvodu předpokládáme, že nižší koncentrace morfinu by mohly být efektivní i v naší studii, pokud by buněčné poškození vyvolané podáváním *t*-BHP bylo výrazně nižší. To potvrzují i naše nepublikované výsledky, které ukázaly, že působení 200 μ M *t*-BHP snížilo buněčnou viabilitu v průměru na 49 %. Preinkubace s 0,1 mM morfinem pak působila výrazně protektivně a dokázala zvýšit viabilitu buněk o 39 %.

Kardioprotektivní působení opioidů může být zřejmě přenášeno aktivací signální dráhy p38 MAPK (Fryer *et al.*, 2001; Peart *et al.*, 2007). Doposud však existuje pouze jediná studie, která popisuje kardioprotektivní efekt aktivace p38 MAPK po podání morfinu (Zhang *et al.*, 2007). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli otestovat zapojení p38 MAPK signální dráhy do protektivního působení morfinu v buněčné linii H9c2. Výsledky našich experimentů ukázaly, že působení morfinu výrazně zvýšilo aktivační fosforylaci p38 MAPK a zároveň zcela potlačilo negativní vliv působení *t*-BHP na aktivitu této kinázy. Protektivní působení morfinu bylo současně sníženo působením inhibitoru p38 MAPK SB 203580 (snížení viability o 21 %). Gutiérrez-Uzquiza *et al.* (2012) ve své studii provedené na buněčné linii MEF (myší embryonální fibroblasty), současně popsala, že aktivace p38 MAPK zvyšovala viabilitu buněk, které byly vystaveny oxidativnímu stresu, přičemž zároveň zvýšila hladinu antioxidačních enzymů SOD a katalázy a snížila akumulaci ROS. Aktivita p38 MAPK by tak teoreticky mohla být zodpovědná za zvýšenou hladinu katalázy, kterou v našich experimentech indukovalo podávání morfinu. Důležité je však dodat, že protektivní efekt aktivace p38 MAPK je pravděpodobně závislý na době aktivace. Zatímco aktivace p38 MAPK před ischemií vykazuje protektivní účinky (Fryer *et al.*, 2001; Peart *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007),

aktivace p38 MAPK během reperfuze je spojená se zvýšeným poškozením tkáně (Chen *et al.*, 2016b).

Klíčovým krokem kardioprotektivního působení morfinu je inaktivace GSK-3 β , ke které dochází po její fosforylaci na serinovém zbytku Ser⁹ (Gross *et al.*, 2004). Inhibice GSK-3 β zamezuje otevírání mPTP a tak napomáhá udržovat membránový potenciál, jehož ztráta je spojená se ztrátou respirační funkce mitochondrií a extenzivní produkcí ROS (Juhaszova *et al.*, 2004; Obame *et al.*, 2008). Působení *t*-BHP v našich experimentech výrazně snižovalo poměr p-GSK-3 β (Ser⁹)/GSK-3 β . Preinkubace s morfinem dokázala zcela zrušit negativní vliv *t*-BHP a signifikantně zvýšila poměr p-GSK-3 β (Ser⁹)/GSK-3 β . Protektivní působení morfinu bylo zároveň částečně blokováno inhibitorem PI3K wortmanninem (snížení viability o 32 %). Kináza PI3K přitom zprostředkovává kardioprotektivní efekt MPC v potkaních srdcích skrze inhibici GSK-3 β (Gross *et al.*, 2004). Lze proto předpokládat, že protektivní efekt aktivace PI3K byl v naší studii navozen právě downregulací signální dráhy GSK-3 β . Výsledky našich experimentů zároveň ukázaly, že při současném podání inhibitorů PI3K wortmanninu a p38 MAPK SB 203580 docházelo k násobnému snížení cytoprotektivního vlivu morfinu (snížení viability o 50 %). Z toho plyne, že pro zprostředkování protektivního efektu morfinu byla důležitá současná aktivace signální dráhy PI3K i p38 MAPK.

Otevírání mPTP kanálů může být regulované také proteiny Bax a Bcl-2. Zatímco pro-apoptotický protein Bax usnadňuje otevírání mPTP (Karch *et al.*, 2013), anti-apoptotický protein Bcl-2 naopak zvyšuje resistenci mPTP k otevření (Marzo *et al.*, 1998). Příznivý poměr Bcl-2/Bax je tak nezbytný pro zajištění přežívání buňky. Výsledky naší studie ukázaly, že působení *t*-BHP snížilo expresi Bcl-2 a zvýšilo expresi Bax. Preinkubace s morfinem vedla k zachování poměru Bcl-2/Bax odpovídajícímu kontrolní úrovni a zcela tak zamezila negativnímu vlivu *t*-BHP. Podobný závěr přinesla i nedávná studie Amini-Khoei *et al.* (2016), ve které morfin dokázal zamezit nepříznivému snížení poměru Bcl-2/Bax, ke kterému docházelo po působení oxidu arsenitého.

Na závěr je nutné dodat, že použití modelu potkaních kardiomyoblastů H9c2 nese určitá interpretační rizika. Nedávná proteomická analýza využívající metodu iTRAQ totiž odhalila, že buňky linie H9c2 svou proteomickou výbavou připomínají spíše nezralé myogenní buňky. H9c2 buňky tak zdaleka nedosahují fenotypu neonatálních ani dospělých kardiomyocytů, i když jsou stále velmi často používány jako jejich alternativní

model. H9c2 buňky pravděpodobně postrádají proteiny nezbytné pro tvorbu myofibril a nedokáží exprimovat mnoho proteinů, které jsou důležité pro metabolismus svalových buněk (Lenčo *et al.*, 2015). Přes uvedené výhrady tyto buňky představují stále velmi rozšířený *in vitro* model užitečný pro studium buněčných procesů a jejich molekulárních mechanismů v různých experimentálních podmínkách.

8. Závěr

8.1. Model in vivo – potkan kmene Wistar

Ukázali jsme, že dlouhodobé podávání vysokých dávek morfinu (10 mg/kg/den) potkanům neovlivnilo množství a afinitu myokardiálních β -AR, ale téměř zdvojnásobilo množství dominantní myokardiální izoformy AC V/VI. Tato změna byla doprovázena výraznou supersenzibilizací AC a sníženou schopností opioidních agonistů inhibovat forskolinem stimulovanou aktivitu AC.

Dlouhodobé podávání vysokých dávek morfinu bylo spojené se změnami proteomu levé srdeční komory, když docházelo ke snížení exprese cytoprotektivního proteinu ALDH2 a zvýšení exprese proteinů zapojených do signalizace buňky (PIPT a MVP), molekulárních chaperonů (HSP27, HSC70, ORP150 a GRP78) a strukturálních proteinů myofibril (desmin a α aktinu 1 srdečního svalu). Zvýšená exprese molekulárních chaperonů byla zprostředkována aktivací OR, přičemž tři dny po aplikaci poslední dávky morfinu se jejich exprese navrátila na kontrolní úroveň.

Komplexní proteomická analýza iTRAQ odhalila, že podávání morfinu nebo jeho vysazení indukovalo změnu v expresi u celkem 237 proteinů levé srdeční komory. Zatímco dlouhodobé podávání morfinu změnilo expresi 72 proteinů, 3 dny po vysazení morfinu byla exprese změněná u 105 proteinů a 6 dní po vysazení u 60 proteinů. Podávání morfinu i jeho vysazení indukovalo signifikantní upregulaci v expresi heat shock proteinů (HSP27, α -B crystallin, HSP70, HSP10 a HSP60) a expresi p38 MAPK, která je dobře známá tím, že může fosforylovat (a aktivovat) HSP27 a α -B crystallin. Působení morfinu zároveň zvýšilo aktivační fosforylaci HSP27, míra fosforylace byla nejvyšší 3 dny po ukončení podávání morfinu a 6. den se navrátila na kontrolní hladinu. Žádné změny nebyly pozorovány v expresi proteinů, které jsou zapojeny do regulace oxidativního stresu.

Ačkoli dlouhodobé působení morfinu v dávce 10 mg/kg/den zvyšovalo expresi molekulárních chaperonů HSP, které mají výrazné cytoprotektivní vlastnosti, navozený kardioprotektivní fenotyp byl v našich experimentech dostatečný pouze pro snížení incidence ventrikulárních arytmí během ischemie, která byla vyvolána okluzí vzestupné

koronární arterie, avšak nedokázal snížit velikost infarktu ani incidenci arytmií během reperfuze.

Tyto výsledky v souhrnu ukazují, že dlouhodobé podávání vysokých dávek morfinu potkanům výrazně ovlivňuje myokardiální AC signalizaci a vede k četným změnám v proteomu srdeční tkáně, které jsou doprovázené sníženou náchylností k výskytu ventrikulárních arytmií během ischemie. Naše proteomické studie poskytují komplexní pohled na změny v proteomu srdce a zároveň demonstrují, že expresní profil proteinů srdeční tkáně může být poměrně výrazně ovlivněn působením morfinu.

8.2. Model in vitro – buněčná linie potkaních kardiomyoblastů H9c2

Ukázali jsme, že akutní preinkubace s vysokými dávkami morfinu (1 mM) dokáže významně ochránit buněčnou linii H9c2 před oxidativním stresem, který byl vyvoláván působením *t*-BHP. Působení *t*-BHP snížilo počet přežívajících buněk na 3 %. Preinkubace s morfinem působila výrazně protektivně, když dokázala zvýšit viabilitu buněk o 72 %. Oxidativní poškození buněk způsobené *t*-BHP bylo doprovázeno sníženým poměrem exprese anti-apoptotického proteinu Bcl-2/pro-apoptotického proteinu Bax. Preinkubace s morfinem vedla k zachování poměru Bcl-2/Bax odpovídajícímu kontrolní úrovni a zcela tak zamezila negativnímu vlivu *t*-BHP.

Protektivní působení morfinu bylo částečně zprostředkováno současnou aktivací signálních drah PI3K a p38 MAPK. Aktivita PI3K přitom pravděpodobně navozovala svůj protektivní efekt pomocí downregulací signální dráhy GSK-3 β .

Působení morfinu zvýšilo celkovou antioxidační kapacitu buněk a snížilo karbonylaci proteinů, peroxidaci lipidů a celkové množství ROS. Preinkubace s morfinem pak snížila negativní dopad *t*-BHP na všechny výše popsané parametry redoxního stavu buněk. Morfin zároveň zvýšil expresi antioxidačního enzymu katalázy a neměl vliv na expresi SOD 1.

Ve druhé části projektu jsme ukázali, že morfin může v in vitro podmínkách vykazovat silné antioxidační účinky a dokáže významně ochránit H9c2 buňky před oxidativním stresem. Cytoprotektivní působení morfinu bylo alespoň z části přenášené

signálními dráhami p38 MAPK a PI3K/GSK-3 β . Vzhledem k tomu, že se fenotyp H9c2 buněk podstatně liší od fenotypu kardiomyocytů, bylo by v budoucnu zajímavé ověřit naše výsledky přímo na primárních kulturách kardiomyocytů.

9. Seznam použité literatury

Abruzzo, P. M., di Tullio, S., Marchionni, C., Belia, S., Fano, G., Zampieri, S., Carraro, U., Kern, H., Sgarbi, G., Lenaz, G., Marini, M. (2010) Oxidative stress in the denervated muscle. *Free Radic Res*, 44(5), 563-576.

Aggeli, I.-K. S., Beis, I. and Gaitanaki, C. (2008) Oxidative stress and calpain inhibition induce alpha B-crystallin phosphorylation via p38-MAPK and calcium signalling pathways in H9c2 cells. *Cellular Signalling*, 20(7), 1292–1302.

Akil, H., Owens, C., Gutstein, H., Taylor, L., Curran, E. Watson, S. (1998) Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug and alcohol dependence*, 51(1-2), 127–140.

Akira, S., Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4(7), 499–511.

Almeida, M. B., Costa-Malaquias, A., Nascimento, J. L. M., Oliveira, K. R., Herculano, A. M., Crespo-López, M. E. (2014) Therapeutic concentration of morphine reduces oxidative stress in glioma cell line. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(5), 398–402.

Amini-Khoei, H., Hosseini, M.-J., Momeny, M., Rahimi-Balaei, M., Amiri, S., Haj-Mirzaian, A., Khedri, M., Jahanabadi, S., Mohammadi-Asl, A., Mehr, S. E., Dehpour, A. R. (2016) Morphine attenuated the cytotoxicity induced by arsenic trioxide in H9c2 cardiomyocytes. *Biological Trace Element Research*, 173(1), 132–139.

Ammer, H., Schulz, R. (1997) Chronic morphine treatment increases stimulatory beta-2 adrenoceptor signaling in A431 cells stably expressing the mu opioid receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 280(1), 512–20.

Andersen, G., Christrup, L., Sjøgren, P. (2003) Relationships Among Morphine Metabolism, Pain and Side Effects During Long-Term Treatment. *Journal of Pain and Symptom Management*, 25(1), 74–91.

Arabian, M., Aboutaleb, N., Soleimani, M., Ajami, M., Habibey, R., Pazoki-Toroudi, H. (2017) Activation of mitochondrial KATP channels mediates neuroprotection induced by chronic morphine preconditioning in hippocampal CA-1 neurons following cerebral ischemia. *Advances in Medical Sciences*, 63(2), 213-219.

Ashton, K. J., Tupicoff, A., Williams-Pritchard, G., Kiessling, C. J., See Hoe, L. E., Headrick, J. P., Peart, J. N. (2013) Unique Transcriptional Profile of Sustained Ligand-Activated Preconditioning in Pre- and Post-Ischemic Myocardium. *PLoS ONE*, 8(8), e72278.

Asaf, S., Shah, S. A., Khan, M. A., Nasir, J. A., Waqar, T., Gill, M. A., Jabeen, U. (2011) Morphine Based Anesthetic Allows Early Discharge from the Intensive Care Unit in Children Undergoing Cardiac Surgery. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*, 5 (3), 484-486.

Avidor-Reiss, T., Nevo, I., Levy, R., Pfeuffer, T., Vogel, Z. (1996) Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of Gbetagamma. *The Journal of biological chemistry*, 271(35), 21309–15.

Barksdale, K. A., Bijur, G. N. (2009) The basal flux of Akt in the mitochondria is mediated by heat shock protein 90. *Journal of Neurochemistry*, 108(5), 1289–1299.

Barrère-Lemaire, S., Combes, N., Sportouch-Dukhan, C., Richard, S., Nargeot, J., Piot, C. (2005) Morphine mimics the antiapoptotic effect of preconditioning via an Ins(1,4,5)P₃ signaling pathway in rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288(1), H83–H88.

Barry, U., Zuo, Z. (2005) Opioids: Old Drugs for Potential New Applications. *Current Pharmaceutical Design*, 11(10), 1343–1350.

Beattie, W. S., Buckley, D. N., Forrest, J. B. (1993) Epidural morphine reduces the risk of postoperative myocardial ischaemia in patients with cardiac risk factors. *Canadian Journal of Anaesthesia*, 40(6), 532–541.

- Belcheva, M. M., Clark, A. L., Haas, P. D., Serna, J. S., Hahn, J. W., Kiss, A., Coscia, C. J.** (2005) Mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAPK via different protein kinase C isoforms and secondary messengers in astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(30), 27662–27669.
- Belcheva, M. M., Vogel, Z., Ignatova, E., Avidor-Reiss, T., Zippel, R., Levy, R., Young, E. C., Barg, J., Coscia, C. J.** (1998) Opioid Modulation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Activity Is Ras-Dependent and Involves Gβγ Subunits. *Journal of Neurochemistry*, 70(2), 635–645.
- Bell, R. M., Yellon, D. M.** (2003) Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35(2), 185–193.
- Bell, S. P., Sack, M. N., Patel, A., Opie, L. H., Yellon, D. M.** (2000) Delta opioid receptor stimulation mimics ischemic preconditioning in human heart muscle. *Journal of the American College of Cardiology*, 36(7), 2296–2302.
- Bellandi, B., Zocchi, C., Xanthopoulou, I., Scudiero, F., Valenti, R., Migliorini, A., Antoniucci, D., Marchionni, N., Alexopoulos, D., Parodi, G.** (2016) Morphine use and myocardial reperfusion in patients with acute myocardial infarction treated with primary PCI. *International Journal of Cardiology*, 221, 567–571.
- Benarroch, E. E.** (2012) Endogenous opioid systems: Current concepts and clinical correlations. *Neurology*, 79(8), 807–814.
- Benyamin, R., Trescot, A. M., Datta, S., Buenaventura, R., Adlaka, R., Sehgal, N., Glaser, S. E., Vallejo, R.** (2008) Opioid complications and side effects. *Pain Physician*, 11(2 Suppl), S105-20.
- Bernardini, C., Fantinati, P., Zannoni, A., Forni, M., Tamanini, C., Bacci, M. L.** (2004) Expression of HSP70/HSC70 in swine blastocysts: effects of oxidative and thermal stress. *Molecular Reproduction and Development*, 69(3):303-307.

- Beurel, E., Jope, R. S.** (2006) The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Progress in Neurobiology*, 79(4), 173–189.
- Bian, J.-M., Wu, N., Su, R.-B., Li, J.** (2012) Opioid Receptor Trafficking and Signaling: What Happens After Opioid Receptor Activation? *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(2), 167–184.
- Bierczynska-Krzysik, A., John, J. P. P., Silberring, J., Kotlinska, J., Dylag, T., Cabatic, M., Lubec, G.** (2006) Proteomic analysis of rat cerebral cortex, hippocampus and striatum after exposure to morphine. *International Journal of Molecular Medicine*, 18(4), 775–784.
- Blunt, B. C., Creek, A. T., Henderson, D. C., Hofmann, P. A.** (2007) H₂O₂ activation of HSP25/27 protects desmin from calpain proteolysis in rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293(3), H1518-H1525.
- Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Lin, F.-T., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G.** (2000) μ -Opioid receptor desensitization by β -arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, 408(6813), 720–723.
- Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Peppel, K., Caron, M. G., Lin, F.-T.** (1999) Enhanced Morphine Analgesia in Mice Lacking β -Arrestin 2. *Science*, 286(5449), 2495–2495.
- Bolli, R., Dawn, B., Xuan, Y.-T.** (2003) Role of the JAK-STAT pathway in protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Trends in cardiovascular medicine*, 13(2), 72–79.
- Boluyt, M. O., Younes, A., Caffrey, J. L., O'Neill, L., Barron, B. A., Crow, M. T., Lakatta, E. G.** (1993) Age-associated increase in rat cardiac opioid production. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 265(1), H212-H218.

Bonin, M., Mewton, N., Roubille, F., Morel, O., Cayla, G., Angoulvant, D., Elbaz, M., Claeys, M. J., Garcia-Dorado, D., Giraud, C., Rioufol, G., Jossan, C., Ovize, M., Guerin, P., the CIRCUS Study Investigators (2018) Effect and Safety of Morphine Use in Acute Anterior ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association*, 7, e006833.

Borges, R. S., Vale, J. K. L., Pereira, G. A. N., Veiga, A. A. S., Junior, J. B., da Silva, A. B. F. (2016) An antioxidant mechanism of morphine and related derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 25(5), 852–857.

Bøtker, H. E., Kharbanda, R., Schmidt, M. R., Böttcher, M., Kaltoft, A. K., Terkelsen, C. J., Munk, K., Andersen, N. H., Hansen, T. M., Trautner, S., Lassen, J. F., Christiansen, E. H., Krusell, L. R., Kristensen, S. D., Thuesen, L., Nielsen, S. S., Rehling, M., Sørensen, H. T., Redington, A. N., Nielsen, T. T. (2010) Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *The Lancet*, 375(9716), 727–734.

Brown, J. M., Grosso, M. A., Terada, L. S., Whitman, G. J., Banerjee, A., White, C. W., Harken, A. H., Repine, J. E. (1989) Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7), 2516–2520.

Brownstein, M. J. (1993) A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(12), 5391–5393.

Brunk, S. F., Delle, M. (1974) Morphine metabolism in man. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 16(1part1), 51–57.

Budas, G. R., Churchill, E. N., Disatnik, M.-H., Sun, L., Mochly-Rosen, D. (2010) Mitochondrial import of PKC ϵ is mediated by HSP90: a role in cardioprotection from ischaemia and reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 88(1), 83–92.

Cadet, P. (2004) Mu opiate receptor subtypes. *Medical Science Monitor*, 10(6), MS28–32.

- Cechowska-Pasko, M., Bankowski, E., Chene, P.** (2006) The effect of hypoxia on the expression of 150 kDa oxygen-regulated protein (ORP 150) in HeLa cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 17(1–2), 89–96.
- Cockcroft, S., Garner, K.** (2011) Function of the phosphatidylinositol transfer protein gene family: is phosphatidylinositol transfer the mechanism of action? *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46(2), 89–117.
- Connor, M., Christie, M. J.** (1999) Opioid Receptor Signalling Mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26(7), 493–499.
- Costa-Malaquias, A., Almeida, M. B., Souza Monteiro, J. R., Macchi, B. dM., do Nascimento, J. L. M., Crespo-Lopez, M. E.** (2014) Morphine protects against methylmercury intoxication: a role for opioid receptors in oxidative stress? *PLoS ONE*, 9(10), e110815.
- Cunha-Oliveira, T., Silva, L., Silva, A. M., Moreno, A. J., Oliveira, C. R., Santos, M. S.** (2013) Acute effects of cocaine, morphine and their combination on bioenergetic function and susceptibility to oxidative stress of rat liver mitochondria. *Life Sciences*, 92(24), 1157–1164.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M. E.** (1997) Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*, 91(2), 231–241.
- DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Déry, O., Mullins, R. D., Bunnnett, N. W.** (2000) β -arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *The Journal of Cell Biology*, 148(6), 1267–1281.
- Dietis, N., Rowbotham, D. J., Lambert, D. G.** (2011) Opioid receptor subtypes: fact or artifact? *British Journal of Anaesthesia*, 107(1), 8–18.
- Doll, C., Pöll, F., Peuker, K., Loktev, A., Glück, L., Schulz, S.** (2012) Deciphering μ -opioid receptor phosphorylation and dephosphorylation in HEK293 cells. *British Journal of Pharmacology*, 167(6), 1259–1270.

Dorsch, M., Behmenburg, F., Raible, M., Blase, D., Grievink, H., Hollmann, M. W., Heinen, A., Huhn, R. (2016) Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore. *PLoS ONE*, 11(3), e0151025.

Du, Y.-H., Peng, J., Huang, Z.-Z., Jiang, D.-J., Deng, H.-W., Li, Y.-J. (2004) Delayed cardioprotection afforded by nitroglycerin is mediated by α -CGRP via activation of inducible nitric oxide synthase. *International Journal of Cardiology*, 93(1), 49–54.

Duman, R. S., Tallman, J. F., Nestler, E. J. (1988) Acute and chronic opiate-regulation of adenylate cyclase in brain: specific effects in locus coeruleus. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 246(3), 1033–1039.

Elgendy, H., Helmy, H. A. R. (2017) Intrathecal Morphine Improves Hemodynamic Parameters and Analgesia in Patients Undergoing Aortic Valve Replacement Surgery: A Prospective, Double-Blind, Randomized Trial. *Pain Physician*, 20(5), 405–412.

Eshraghi, A., Tayyebi, M., Sajjadi, S. S., Bagheri, R. K., Ebdali, R. T., Golnezhad, R. (2017) Morphine Post-Conditioning Effect on QT Dispersion in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention on Anterior Descending Cardiac Artery: A Cohort Study. *Electronic Physician*, 9(1), 3468–3474.

Eslami, H., Sharifi, A. M. (2014) Effect of carnosine on the prevention of high-dose morphine-induced apoptosis of PC12 cells. *Journal of Medical and Bioengineering*, 3(3), 175–178

Espinasse, I., Iourgenko, V., Defer, N., Samson, F., Hanoune, J., Mercadier, J. J. (1995) Type V, but not type VI, adenylyl cyclase mRNA accumulates in the rat heart during ontogenic development. Correlation with increased global adenylyl cyclase activity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27(9), 1789–1795.

Farag, M., Spinthakis, N., Srinivasan, M., Sullivan, K., Wellsted, D., Gorog, D. (2018) Morphine Analgesia Pre-PPCI Is Associated with Prothrombotic State, Reduced Spontaneous Reperfusion and Greater Infarct Size. *Thrombosis and Haemostasis*, 118(3), 601–612.

- Ferdinandy, P., Schulz, R., Baxter, G. F.** (2007) Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacological Reviews*, 59(4), 418–458.
- Franchi, S., Moretti, S., Castelli, M., Lattuada, D., Scavullo, C., Panerai, A. E., Sacerdote, P.** (2012) Mu opioid receptor activation modulates Toll like receptor 4 in murine macrophages. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(3), 480–488.
- Fräßdorf, J., Huhn, R., Niersmann, C., Weber, N. C., Schlack, W., Preckel, B., Hollmann, M. W.** (2010) Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K_{Ca} channels. *Canadian Journal of Anesthesia*, 57(8), 767–773.
- Fryer, R. M., Hsu, A. K., Gross, G. J.** (2001) ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*, 96(2), 136–142.
- Fryer, R. M., Hsu, A. K., Nagase, H., Gross, G. J.** (2000) Opioid-Induced Cardioprotection against Myocardial Infarction and Arrhythmias: Mitochondrial versus Sarcolemmal ATP-Sensitive Potassium Channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294(2), 451–457.
- Fuaro, M., Lemoine, S., Coco, C. Lo, Hanouz, J. L., Massetti, M.** (2013) [d-Ala², d-Leu⁵]-enkephalin (DADLE) and morphine-induced postconditioning by inhibition of mitochondrial permeability transition pore, in human myocardium. *Experimental Biology and Medicine*, 238(4), 426–432.
- Fukagawa, H., Koyama, T., Kakuyama, M., Fukuda, K.** (2013) Microglial activation involved in morphine tolerance is not mediated by toll-like receptor 4. *Journal of Anesthesia*, 27(1), 93–97.
- Goldstein, A., Barrett, R. W., James, I. F., Lowney, L. I., Weitz, C. J., Knipmeyer, L. L., Rapoport, H.** (1985) Morphine and other opiates from beef brain and adrenal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82(15), 5203–5207.

- De Gregori, S., De Gregori, M., Ranzani, G. N., Allegri, M., Minella, C., Regazzi, M.** (2012) Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metabolic Brain Disease*, 27(1), 1–5.
- Gregorian, R. S., Gasik, A., Kwong, W. J., Voeller, S., Kavanagh, S.** (2010) Importance of Side Effects in Opioid Treatment: A Trade-Off Analysis With Patients and Physicians. *The Journal of Pain*, 11(11), 1095–1108.
- Groban, L., Vernon, J. C., Butterworth, J.** (2004) Intrathecal Morphine Reduces Infarct Size in a Rat Model of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesia & Analgesia*, 98(4), 903–909.
- Grobe, N., Lamshöft, M., Orth, R. G., Dräger, B., Kutchan, T. M., Zenk, M. H., Spitteller, M.** (2010) Urinary excretion of morphine and biosynthetic precursors in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), 8147–8152.
- Gross, E. R., Hsu, A. K., Gross, G. J.** (2004) Opioid-Induced Cardioprotection Occurs via Glycogen Synthase Kinase β Inhibition During Reperfusion in Intact Rat Hearts. *Circulation Research*, 94(7), 960–966.
- Gross, E. R., Hsu, A. K., Gross, G. J.** (2006) The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 β . *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(2), H827-H834.
- Gross, E. R., Hsu, A. K., Gross, G. J.** (2007) GSK3 β inhibition and KATP channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion *Basic Research in Cardiology*, 102(4), 341–349.
- Grünblatt, E., Mandel, S., Maor, G., Youdim, M. B. H.** (2008) Effects of R- and S- apomorphine on MPTP-induced nigro-striatal dopamine neuronal loss. *Journal of Neurochemistry*, 77(1), 146–156.
- Gülçin, I.** (2004) In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 49(1), 59–66.

Gurevich, V. V., Gurevich, E. V. (2006) The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 110(3), 465-502.

Gutiérrez-Uzquiza, Á., Arechederra, M., Bragado, P., Aguirre-Ghiso, J. A., & Porras, A. (2012) p38 α mediates cell survival in response to oxidative stress via induction of antioxidant genes: Effect on the p70S6K pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2632-2642.

Gwag, H. B., Kim, E. K., Park, T. K., Lee, J. M., Yang, J. H., Song, Y. B., Choi, J. H., Choi, S. H., Lee, S. H., Chang, S. A., Park, S. J., Lee, S. C., Park, S. W., Jang, W. J., Lee, M., Chun, W. J., Oh, J. H., Park, Y. H., Choe, Y. H., Gwon, H. C., Hahn, J. Y. (2017) Cardioprotective effects of intracoronary morphine in ST-segment elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a prospective, randomized trial. *Journal of the American Heart Association*, 6(4), 6:e005426.

Hamilton, G. R., Baskett, T. F. (2000) In the arms of morpheus: the development of morphine for postoperative pain relief. *Canadian Journal of Anesthesia*, 47(4), 367-374.

Hamm, H. E., Gilchrist, A. (1996) Heterotrimeric G proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 8(2), 189–196.

Hargrave, B. Y., Tiangco, D. A., Lattanzio, F. A., Beebe, S. J. (2003) Cocaine, not morphine, causes the generation of reactive oxygen species and activation of NF- κ B in transiently cotransfected heart cells. *Cardiovascular Toxicology*, 3(2), 141–151.

Hasselström, J., Säwe, J. (1993) Morphine Pharmacokinetics and Metabolism in Humans. *Clinical Pharmacokinetics*, 24(4), 344–354.

Hatsukari, I., Hitosugi, N., Ohno, R., Hashimoto, K., Nakamura, S., Satoh, K., Nagasaka, H., Matsumoto, I., Sakagami, H. (2007) Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines in vitro. *Anticancer Research*, 27(2), 857–864.

Hausenloy, D. J., Yellon, D. M. (2004) New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular Research*, 61(3), 448–460.

Hausenloy, D. J., Yellon, D. M. (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 92–100.

He, H., Huh, J., Wang, H., Kang, Y., Lou, J., Xu, Z. (2016) Mitochondrial events responsible for morphine's cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 290, 66–73.

He, S.-F., Jin, S.-Y., Wu, H., Wang, B., Wu, Y.-X., Zhang, S.-J., Irwin, M. G., Wong, T.-M., Zhang, Y. (2015) Morphine preconditioning confers cardioprotection in doxorubicin-induced failing rat hearts via ERK/GSK-3 β pathway independent of PI3K/Akt. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 288(3), 349–358.

He, S.-F., Zhu, H.-J., Han, Z.-Y., Wu, H., Jin, S.-Y., Irwin, M. G. and Zhang, Y. (2016) MicroRNA-133b-5p Is Involved in Cardioprotection of Morphine Preconditioning in Rat Cardiomyocytes by Targeting Fas. *Canadian Journal of Cardiology*, 32(8), 996-1007.

He, S. F., Jin, S. Y., Yang, W., Pan, Y. L., Huang, J., Zhang, S. J., Zhang, L., Zhang, Y. (2018) Cardiac μ -receptor contributes to opioid-induced cardioprotection in chronic heart failure. *British Journal of Anaesthesia*, [Article in Press], doi: 10.1016/j.bja.2017.11.110.

Head, B. P., Patel, H. H., Roth, D. M., Lai, N. C., Niesman, I. R., Farquhar, M. G., Insel, P. A. (2005) G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 31036–31044.

Headrick, J. P., See Hoe, L. E., Du Toit, E. F., Peart, J. N. (2015) Opioid receptors and cardioprotection - “opioidergic conditioning” of the heart. *British Journal of Pharmacology*, 172(8), 2026–2050.

Hejnova, L., Skrabalova, J., Novotny, J. (2017) Prolonged Morphine Treatment Alters Expression and Plasma Membrane Distribution of β -Adrenergic Receptors and Some Other Components of Their Signaling System in Rat Cerebral Cortex. *Journal of Molecular Neuroscience*, 63(3–4), 364-376.

- Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y., Mills, G. B.** (2005) Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(12), 988–1004.
- Heusch, G., Boengler, K., Schulz, R.** (2010) Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the holy grail of cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*, 105(2), 151–154.
- Huhn, R., Heinen, A., Weber, N. C., Schlack, W., Preckel, B., Hollmann, M. W.** (2010) Ischaemic and morphine-induced post-conditioning: impact of mK(Ca) channels. *British Journal of Anaesthesia*, 105(5), 589–595.
- Hutchinson, M. R., Bland, S. T., Johnson, K. W., Rice, K. C., Maier, S. F., Watkins, L. R.** (2007) Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *The Scientific World Journal*, 7(S2), 98–111.
- Chakrabarti, S., Regec, A., Gintzler, A. R.** (2005) Chronic morphine acts via a protein kinase C γ -G β -adenylyl cyclase complex to augment phosphorylation of G β and G $\beta\gamma$ stimulatory adenylyl cyclase signaling. *Molecular Brain Research*, 138(1), 94–103.
- Chan, M.-Y., Dai, S., Ko, W. W. W.** (1987) Effects of morphine on cardiovascular responses to acute myocardial ischaemia in rats. *British Journal of Pharmacology*, 90(3), 537–543.
- Chen, C. H., Sun, L., Mochly-Rosen, D.** (2010) Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovascular Research*, 88(1), 51-57.
- Chen, J.-C., Smith, E. R., Cahill, M., Cohen, R. and Fishman, J. B.** (1993) The opioid receptor binding of dezocine, morphine, fentanyl, butorphanol and nalbuphine. *Life Sciences*, 52(4), 389–396.
- Chen, L., Huang, L.-Y. M.** (1991) Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a μ opioid. *Neuron*, 7(2), 319–326.

Chen, L., Huang, L.-Y. M. (1992) Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature*, 356(6369), 521-523.

Chen, Z., Li, T., Zhang, B. (2008) Morphine Postconditioning Protects Against Reperfusion Injury in the Isolated Rat Hearts. *Journal of Surgical Research*, 145(2), 287-294.

Chen, Z., Spahn, D. R., Zhang, X., Liu, Y., Chu, H., Liu, Z. (2016a) Morphine Postconditioning Protects Against Reperfusion Injury: the Role of Protein Kinase C-Epsilon, Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Mitochondrial Permeability Transition Pores. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(5), 1930-1940.

Chen, Z., Zhang, X., Liu, Y. , Liu, Z. (2016b) Morphine postconditioning protects against reperfusion injury via inhibiting JNK/p38 MAPK and mitochondrial permeability transition pores signaling pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(1), 61-70.

Chien, G. L., Van Winkle, D. M. (1996) Naloxone Blockade of Myocardial Ischemic Preconditioning is Stereoselective. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 28(9), 1895–1900.

Christrup, L. L. (1997) Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 41(1), 116–122.

Ikeda, R., Iwashita, K., Sumizawa, T., Beppu, S., Tabata, S., Tajitsu, Y., Shimamoto, Y., Yoshida, K., Furukawa, T., Che, X. F., Yamaguchi, T., Ushiyama, M., Miyawaki, A., Takeda, Y., Yamamoto, M., Zhao, H. Y., Shibayama, Y., Yamada, K., Akiyama, S. (2008) Hyperosmotic stress up-regulates the expression of major vault protein in SW620 human colon cancer cells. *Experimental Cell Research*, 314(16), 3017-3026.

Iyengar, R. (1993) Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *The FASEB Journal*, (9), 768–775.

Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1997) Receptor-regulated ion channels. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), 155–160.

- Jang, Y., Xi, J., Wang, H., Mueller, R. A., Norfleet, E. A., Xu, Z.** (2008) Postconditioning Prevents Reperfusion Injury by Activating δ -Opioid Receptors. *Anesthesiology*, 108(2), 243–250.
- Jiang, L., Hu, J., He, S., Zhang, L., Zhang, Y.** (2016) Spinal Neuronal NOS Signaling Contributes to Morphine Cardioprotection in Ischemia Reperfusion Injury in Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 358(3), 450–456.
- Jordan, B., Devi, L. A.** (1998) Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *British Journal of Anaesthesia*, 81(1), 12–19.
- Juhaszova, M., Zorov, D. B., Kim, S.-H., Pepe, S., Fu, Q., Fishbein, K. W., Ziman, B. D., Wang, S., Ytrehus, K., Antos, C. L., Olson, E. N., Sollott, S. J.** (2004) Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(11), 1535–1549.
- Kam, A. Y. F., Chan, A. S. L., Wong, Y. H.** (2004) Phosphatidylinositol-3 kinase is distinctively required for μ -, but not κ -opioid receptor-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. *Journal of Neurochemistry*, 89(2), 391–402.
- Karch, J., Kwong, J. Q., Burr, A. R., Sargent, M. A., Elrod, J. W., Peixoto, P. M., Martinez-Caballero, S., Osinska, H., Cheng, E. H.-Y., Robbins, J., Kinnally, K. W., Molkentin, J. D.** (2013) Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *eLife*, 2, e00772.
- Keith, D. E., Murray, S. R., Zaki, P. A., Chu, P. C., Lissin, D. V., Kang, L., Evans, C. J., von Zastrow, M.** (1996) Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19021-19024.
- Kim, H. P., Morse, D., Choi, A. M.** (2006) Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 10(5), 759-769.

- Kim, J. H., Chun, K. J., Park, Y. H., Kim, J., Kim, J. S., Jang, Y. H., Lee, M. Y., Park, J. H.** (2011) Morphine-induced postconditioning modulates mitochondrial permeability transition pore opening via delta-1 opioid receptors activation in isolated rat hearts. *Korean Journal of Anesthesiology*, 61(1), 69-74.
- Kindman, L. A., Kates, R. E., Ginsburg, R.** (1991) Opioids potentiate contractile response of rabbit myocardium to the beta adrenergic agonist isoproterenol. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 17(1), 61–67.
- Kleinbongard, P., Skyschally, A., Heusch, G.** (2017) Cardioprotection by remote ischemic conditioning and its signal transduction. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 469(2), 159–181.
- Kunecki, M., Plazak, W., Podolec, P., Gołba, K. S.** (2017) Effects of endogenous cardioprotective mechanisms on ischemia-reperfusion injury. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 71, 20–31.
- Kuriyama, K., Muramatsu, M., Aiso, M., Ueno, E.** (1981) Alteration in β -adrenergic receptor binding in brain, lung and heart during morphine and alcohol dependence and withdrawal. *Neuropharmacology*, 20(7), 659–666.
- Law, P.-Y.** (2011) Opioid Receptor Signal Transduction Mechanisms. In: *Pasternak, G. W. (eds), The Opiate Receptors. The Receptors*, Humana Press, Totowa, NJ, 195-238.
- Lefkowitz, R. J.** (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(30), 18677–18680.
- Lenčo, J., Lenčová-Popelová, O., Link, M., Jirkovská, A., Tambor, V., Potůčková, E., Stulík, J., Šimůnek, T., Štěřba, M.** (2015) Proteomic investigation of embryonic rat heart-derived H9c2 cell line sheds new light on the molecular phenotype of the popular cell model. *Experimental Cell Research*, 339(2), 174–186.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., Stadtman, E. R.** (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186(C), 464–478.

- Li, R., Wong, G. T. C., Wong, T. M., Zhang, Y., Xia, Z., Irwin, M. G. (2009)** Intrathecal Morphine Preconditioning Induces Cardioprotection via Activation of Delta, Kappa, and Mu Opioid Receptors in Rats. *Anesthesia & Analgesia*, 108(1), 23–29.
- Liang, B. T., Gross, G. J. (1999)** Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and KATP channels. *Circulation Research*, 84(12), 1396–400.
- Lim, S., Smith, K. R., Lim, S.-T. S., Tian, R., Lu, J., Tan, M. (2016)** Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell & Bioscience*, 6:25.
- Lin, K. M., Lin, B., Lian, I. Y., Mestril, R., Scheffler, I. E., Dillmann, W. H. (2001)** Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation*, 103(13), 1787–1792.
- Ling, W. (2017)** Prescription opioid addiction and chronic pain: More than a feeling. *Drug and Alcohol Dependence*, 173(1), S73–S74.
- Ling Ling, J., Wong, G. T. C., Yao, L., Xia, Z., Irwin, M. G. (2010)** Remote pharmacological post-conditioning by intrathecal morphine: cardiac protection from spinal opioid receptor activation. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 54(9), 1097-1104.
- Liu, C., Dai, R., Yu, R., Xu, J. (2011)** Morphine preconditioning, cardioprotection and left ventricular remodelling in rabbits. *Acta Cardiologica*, 66(3), 341–348.
- Lötsch, J., Stockmann, A., Kobal, G., Brune, K., Waibel, R., Schmidt, N., Geisslinger, G. (1996)** Pharmacokinetics of morphine and its glucuronides after intravenous infusion of morphine and morphine-6-glucuronide in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 60(3), 316–325.
- Lu, Y., Dong, C.-S., Yu, J., Li, H. (2012)** Morphine reduces the threshold of remote ischemic preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury in rats: the role of opioid receptors. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 26(3), 403-406.

- Lu, Y., Dong, C., Yu, J., Li, L.** (2011) Role of central and peripheral opioid receptors in the cardioprotection of intravenous morphine preconditioning. *Irish Journal of Medical Science*, 180(4), 881–885.
- Lu, Y., Hu, J., Zhang, Y., Dong, C. S., Wong, G. T. C.** (2015) Remote intrathecal morphine preconditioning confers cardioprotection via spinal cord nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G pathway. *The Journal of Surgical Research*, 193(1), 43–51.
- Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J.** (1999) β -Arrestin-Dependent Formation of β_2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes. *Science*, 283(5402), 655–661.
- Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J.** (2002) The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of Cell Science*, 115(3), 455–465.
- Ma, H., Guo, R., Yu, L., Zhang, Y., Ren, J.** (2011) Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rescues myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of autophagy paradox and toxic aldehyde. *European Heart Journal*, 32(8), 1025–1038.
- Maier, U., Babich, A., Nürnberg, B.** (1999) Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 29311–29317.
- Mann, D.** (2011) Inflammatory Mediators and the Failing Heart: Past, Present, and the Foreseeable Future, *Circulation Research*, 91(11), 988–998.
- Mansour, A., Fox, C. A., Akil, H., Watson, S. J.** (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends in Neurosciences*, 18(1), 22–29.
- Mao, J.** (1999) NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Research Reviews*, 30(3), 289–304.

- Markiewicz, W., Finberg, J. P., Lichtig, C.** (1982) Morphine increases myocardial infarction size in rats. *Anesthesia and Analgesia*, 61(10), 843–846.
- Marmor, M., Penn, A., Widmer, K., Levin, R. I., Maslansky, R.** (2004) Coronary artery disease and opioid use. *The American Journal of Cardiology*, 93(10), 1295–1297.
- Martini, L., Whistler, J. L.** (2007) The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(5), 556–564.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., Rémy, R., Xie, Z.-H., Reed, J. C., Kroemer, G.** (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(8), 1261–1271.
- Matsson, H., Eason, J., Bookwalter, C. S., Klar, J., Gustavsson, P., Sunnegårdh, J., Enell, H., Jonzon, A., Vikkula, M., Gutierrez, I., Granados-Riveron, J., Pope, M., Bu'Lock, F., Cox, J., Robinson, T. E., Song, F., Brook, D. J., Marston, S., Trybus, K. M., Dahl, N.** (2008) Alpha-cardiac actin mutations produce atrial septal defects. *Human Molecular Genetics*, 17(2), 256–265.
- Mattioli, T. A., Leduc-Pessah, H., Skelhorne-Gross, G., Nicol, C. J. B., Milne, B., Trang, T., Cahill, C. M.** (2014) Toll-Like Receptor 4 Mutant and Null Mice Retain Morphine-Induced Tolerance, Hyperalgesia, and Physical Dependence. *PLoS ONE*, 9(5), e97361.
- Mayr, B., Montminy, M.** (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(8), 599–609.
- McPherson, B. C., Yao, Z.** (2001) Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial K(ATP) channels in myocytes. *Circulation*, 103(2), 290–295.
- Mendis, S., Puska, P., Norrving, B.** (2011) Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. *World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization*.

- Meng, X., Ao, L., Brown, J. M., Meldrum, D. R., Sheridan, B. C., Cain, B. S., Banerjee, A., Harken, A. H.** (1997) LPS induces late cardiac functional protection against ischemia independent of cardiac and circulating TNF- α . *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 273(4), H1894–H1902.
- Meunier, J.-C., Mouldous, L., Topham, C. M.** (2000) The nociceptin (ORL1) receptor: molecular cloning and functional architecture. *Peptides*, 21(7), 893–900.
- Miki, T., Cohen, M. V., Downey, J. M.** (1998) Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 186(1/2), 3–12.
- Miller, W. E., Maudsley, S., Ahn, S., Khan, K. D., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J.** (2000) β -arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of β -arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11312–11319.
- Minami, M., Satoh, M.** (1995) Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neuroscience Research*, 23(2), 121–145.
- Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J.-L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G., Meunier, J.-C.** (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Letters*, 341(1), 33–38.
- Mosmann, T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- Mourouzis, I., Saranteas, T., Perimenis, P., Tesseromatis, C., Kostopanagiotou, G., Pantos, C., Cokkinos, D.** (2009) Morphine administration at reperfusion fails to improve postischemic cardiac function but limits myocardial injury probably via heat-shock protein 27 phosphorylation. *European Journal of Anaesthesiology*, 26(7), 572–581.

- Murphy, G. S., Szokol, J. W., Marymont, J. H., Avram, M. J., Vender, J. S. (2006)** Opioids and cardioprotection: the impact of morphine and fentanyl on recovery of ventricular function after cardiopulmonary bypass. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 20(4), 493-502.
- Murphy, G. S., Szokol, J. W., Marymont, J. H., Avram, M. J., Vender, J. S. (2007)** The Effects of Morphine and Fentanyl on the Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass in Patients Undergoing Elective Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *Anesthesia & Analgesia*, 104(6), 1334–1342.
- Murphy, G. S., Szokol, J. W., Marymont, J. H., Greenberg, S. B., Avram, M. J., Vender, J. S., Sherwani, S. S., Nisman, M., Doroski, V. (2009)** Morphine-Based Cardiac Anesthesia Provides Superior Early Recovery Compared with Fentanyl in Elective Cardiac Surgery Patients. *Anesthesia & Analgesia*, 109(2), 311–319.
- Murry, C. E., Jennings, R. B., Reimer, K. A. (1986)** Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124–1136
- Murthy, K. S., Makhoulf, G. M. (1996)** Opioid mu, delta, and kappa receptor-induced activation of phospholipase C-beta 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by Gi2 and G(o) in smooth muscle. *Molecular Pharmacology*, 50(4), 870-877.
- Muscoli, C., Cuzzocrea, S., Ndengele, M. M., Mollace, V., Porreca, F., Fabrizi, F., Esposito, E., Masini, E., Matuschak, G. M., Salvemini, D. (2007)** Therapeutic manipulation of peroxynitrite attenuates the development of opiate-induced antinociceptive tolerance in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3530-3539.
- Napier, L. D., Roerig, S. C., Yoshishige, D. A., Barron, B. A., Caffrey, J. L. (1999)** Canine cardiac muscarinic receptors, G proteins, and adenylate cyclase after long-term morphine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 291(2), 725-732.
- North, R. A. (1986)** Opioid receptor types and membrane ion channels. *Trends in Neurosciences*, 9, 114–117.

- Obame, F. N., Plin-Mercier, C., Assaly, R., Zini, R., Dubois-Randé, J. L., Berdeaux, A., Morin, D.** (2008) Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 β , SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(1), 252-258.
- Ocaña, M., Cendán, C. M., Cobos, E. J., Entrena, J. M., Baeyens, J. M.** (2004) Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *European Journal of Pharmacology*, 500(1–3), 203–219.
- Ocaña, M., Pozo, E., Barrios, M., Baeyens, J. M.** (1995) Subgroups among μ -opioid receptor agonists distinguished by ATP-sensitive K⁺ channel-acting drugs. *British Journal of Pharmacology*, 114(6), 1296–1302.
- Okubo, S., Tanabe, Y., Takeda, K., Kitayama, M., Kanemitsu, S., Kukreja, R. C., Takekoshi, N.** (2004) Ischemic preconditioning and morphine attenuate myocardial apoptosis and infarction after ischemia-reperfusion in rabbits: role of δ -opioid receptor. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 287(4), H1786-H1791
- Olianas, M. C., Dedoni, S., Onali, P.** (2011) Regulation of PI3K/Akt signaling by N-desmethyldiazepam through activation of δ -opioid receptor', *European Journal of Pharmacology*, 660(2–3), 341–350.
- Omeland, T., Lie, R. T., Aakvaag, A., Aarsland, T., Dickstein, K.** (1994) Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation*, 89(4), 1573–1579.
- Omran, A. M.** (2017) Role of intra-aortic morphine in post conditioning during valvular surgery with low ejection fraction. *Journal of the Egyptian Society of Cardio-Thoracic Surgery*, 25(4), 301–305.
- Pan, J., Zhang, Q., Zhang, Y., Ouyang, Z., Zheng, Q., Zheng, R.** (2005) Oxidative stress in heroin administered mice and natural antioxidants protection. *Life Sciences*, 77(2), 183–193.

- Pap, M., Cooper, G. M.** (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 19929–19932.
- Paradis, P., Dumont, M., Bélichard, P., Rouleau, J.-L., Lemaire, S., Brakier-Gingras, L.** (1992) Increased preproenkephalin A gene expression in the rat heart after induction of a myocardial infarction. *Biochemistry and Cell Biology*, 70(7), 593–598.
- Pasternak, G. W.** (2007) When it comes to opiates, just say NO. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3185–3187.
- Pasternak, G. W.** (2014) Opioids and their receptors: Are we there yet? *Neuropharmacology*, 76(B), 198–203.
- Payabvash, S., Beheshtian, A., Salmasi, A. H., Kiumehr, S., Ghahremani, M. H., Tavangar, S. M., Sabzevari, O., Dehpour, A. R.** (2006) Chronic morphine treatment induces oxidant and apoptotic damage in the mice liver. *Life Sciences*, 79(10), 972–980.
- Peart, J. N., Gross, E. R., Headrick, J. P., Gross, G. J.** (2007) Impaired p38 MAPK/HSP27 signaling underlies aging-related failure in opioid-mediated cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(5), 972–980.
- Peart, J. N., Gross, G. J.** (2003) Adenosine and opioid receptor-mediated cardioprotection in the rat: evidence for cross-talk between receptors. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(1), H81–H89.
- Peart, J. N., Gross, G. J.** (2004a) Chronic exposure to morphine produces a marked cardioprotective phenotype in aged mouse hearts. *Experimental Gerontology*, 39(7), 1021–1026.
- Peart, J. N., Gross, G. J.** (2004b) Morphine-tolerant mice exhibit a profound and persistent cardioprotective phenotype. *Circulation*, 109(10), 1219–1222.
- Peart, J. N., Gross, G. J.** (2006) Cardioprotective effects of acute and chronic opioid treatment are mediated via different signaling pathways. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(4), H1746–H1753.

- Peart, J. N., Hoe, L. E. S., Gross, G. J., Headrick, J. P.** (2011) Sustained ligand-activated preconditioning via δ -opioid receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(1), 274–281.
- Peng, J., Sarkar, S., Chang, S. L.** (2012) Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug and Alcohol Dependence*, 124(3), 223–228.
- Pepe, S., Xiao, R. P., Hohl, C., Altschuld, R., Lakatta, E. G.** (1997) “Cross talk” between opioid peptide and adrenergic receptor signaling in isolated rat heart. *Circulation*, 95(8), 2122–2129.
- Pierce, K. L., Lefkowitz, R. J.** (2001) Classical and new roles of β -arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10), 727-733.
- Piper, H., García-Dorado, D., Ovize, M.** (1998) A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 38(2), 291–300.
- Pugsley, M. K.** (2002) The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics*, 93(1), 51–75.
- Radford, N. B., Fina, M., Benjamin, I. J., Moreadith, R. W., Graves, K. H., Zhao, P., Gavva, S., Wiethoff, A., Sherry, A. D., Malloy, C. R., Williams, R. S.** (1996) Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), 2339–2342.
- Raman, M., Chen, W., Cobb, M. H.** (2007) Differential regulation and properties of MAPKs'. *Oncogene*, 26(22), 3100–3112.
- Randhawa, P. K., Jaggi, A. S.** (2017) Opioids in Remote Ischemic Preconditioning-Induced Cardioprotection. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 22(2), 112–121.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K.** (2003) Pharmacology, 5th edition. New York, Churchill Livingstone, 3-4.

- Rawlings, J. S., Rosler, K. M., Harrison, D. A.** (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 117(8), 1281–1283.
- Ray, P. S., Martin, J. L., Swanson, E. A., Otani, H., Dillmann, W. H., Das, D. K.** (2001) Transgene overexpression of α B crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion. *The FASEB Journal*, 15(2), 393–402.
- Reiter, E., Lefkowitz, R. J.** (2006) GRKs and β -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 17(4), 159–165.
- Rentoukas, I., Giannopoulos, G., Kaoukis, A., Kossyvakis, C., Raisakis, K., Driva, M., Panagopoulou, V., Tsarouchas, K., Vavetsi, S., Pyrgakis, V., Deftereos, S.** (2010) Cardioprotective Role of Remote Ischemic Perconditioning in Primary Percutaneous Coronary Intervention: Enhancement by Opioid Action. *JACC: Cardiovascular Interventions*, 3(1), 49–55.
- Rittner, H. L., Brack, A., Machelska, H., Mousa, S. A., Bauer, M., Schäfer, M., Stein, C.** (2001) Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology*, 95(2), 500–508.
- Rockman, H. A., Koch, W. J., Lefkowitz, R. J.** (2002) Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, 415(6868), 206–212.
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., Kobilka, B. K.** (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356–363.
- Rozenfeld, R., Devi, L. A.** (2007) Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: β -arrestin2-mediated ERK activation by μ - δ opioid receptor heterodimers. *The FASEB Journal*, 21(10), 2455–2465.
- Rubovitch, V., Gafni, M., Sarne, Y.** (2003) The mu opioid agonist DAMGO stimulates cAMP production in SK-N-SH cells through a PLC–PKC– Ca^{++} pathway. *Molecular Brain Research*, 110(2), 261–266.

Salazar, N. C., Chen, J., Rockman, H. A. (2007) Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(4), 1006–1018.

Salemi, S., Aeschlimann, A., Reisch, N., Jüngel, A., Gay, R. E., Heppner, F. L., Michel, B. A., Gay, S., Sprott, H. (2005) Detection of kappa and delta opioid receptors in skin—Outside the nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(2), 1012–1017.

Sardão, V. A., Oliveira, P. J., Holy, J., Oliveira, C. R., Wallace, K. B. (2007) Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide – characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biology*, 8:11.

Shahabi, N. A., McAllen, K., Sharp, B. M. (2006) δ opioid receptors stimulate Akt-dependent phosphorylation of c-jun in T cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(2), 933–939.

Sharma, S. K., Klee, W. A., Nirenberg, M. (1975) Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(8), 3092–3096.

Shimamoto, A., Chong, A., Yada, M., Shomura, S., Takayama, H., Fleisig, A., Agnew, M., Hampton, C., Rothnie, C., Spring, D., Pohlman, T., Shimpo, H., Verrier, E. (2006) Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 114(1 Suppl), I270-I274.

Schallmach, E., Steiner, D., Vogel, Z. (2006) Adenylyl cyclase type II activity is regulated by two different mechanisms: Implications for acute and chronic opioid exposure. *Neuropharmacology*, 50(8), 998–1005.

Schiff Jr, P. L. (2002) Opium and its alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 66(2), 186-194.

Schultz, J. E. J., Hsu, A. K., Gross, G. J. (1996) Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circulation Research*, 78(6), 1100-1104.

Schultz, J. E., Rose, E., Yao, Z., Gross, G. J. (1995) Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *The American Journal of Physiology*, 268(5), H2157-H2161.

Schultz, J. J., Hsu, A. K., Gross, G. J. (1997) Ischemic Preconditioning is Mediated by a Peripheral Opioid Receptor Mechanism in the Intact Rat Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(5), 1355–1362.

Schulz, S., Mayer, D., Pfeiffer, M., Stumm, R., Koch, T., Höllt, V. (2004) Morphine induces terminal μ -opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *The EMBO Journal*, 23(16), 3282–3289.

Skrabalova, J., Drastichova, Z., Novotny, J. (2013) Morphine as a potential oxidative stress-causing agent. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 10(4), 367–372.

Small, B. A., Lu, Y., Hsu, A. K., Gross, G. J., Gross, E. R. (2015) Morphine Reduces Myocardial Infarct Size via Heat Shock Protein 90 in Rodents. *BioMed Research International*, (2015), 129612.

Smith, F. L., Stevens, D. L. (1995) Calcium modulation of morphine analgesia: role of calcium channels and intracellular pool calcium. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 272(1), 290–299.

Sobanski, P., Krajnik, M., Shaqura, M., Bloch-Boguslawska, E., Schäfer, M., Mousa, S. A. (2014) The presence of μ -, δ -, and κ -opioid receptors in human heart tissue. *Heart and Vessels*, 29(6), 855–863.

Spratt, D. E., Taiakina, V., Guillemette, J. G. (2007) Calcium-deficient calmodulin binding and activation of neuronal and inducible nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1774(10), 1351–1358.

Springhorn, J. P., Claycomb, W. C. (1992) Translation of heart preproenkephalin mRNA and secretion of enkephalin peptides from cultured cardiac myocytes. *The American Journal of Physiology*, 263(5 Pt 2), H1560-H1566.

Standifer, K. M., Pasternak, G. W. (1997) G proteins and opioid receptor-mediated signalling. *Cellular Signalling*, 9(3–4), 237–248.

- Stefano, G. B., Cadet, P., Kream, R. M., Zhu, W.** (2008) The Presence of Endogenous Morphine Signaling in Animals. *Neurochemical Research*, 33(10), 1933–1939.
- Steiner, D., Avidor-Reiss, T., Schallmach, E., Butovsky, E., Lev, N., Vogel, Z.** (2005) Regulation of adenylyl cyclase type VIII splice variants by acute and chronic Gi/o-coupled receptor activation. *The Biochemical Journal*, 386(Pt 2), 341–348.
- Stoelting, R. K., Miller, R. D.** (2007) Basics of anesthesia – 5th edition, *Philadelphia, Churchill Livingstone*.
- Stone, A. N., Mackenzie, P. I., Galetin, A., Houston, J. B., Miners, J. O.** (2003) Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human udp-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*, 31(9), 1086–1089.
- Sumathi, T., Nathiya, V. C., Sakthikumar, M.** (2011) Protective effect of bacoside-A against morphine-induced oxidative stress in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(4), 409–415.
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W., Gilman, A. G.** (1996) Complexity and Diversity of Mammalian Adenylyl Cyclases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36(1), 461–480.
- Sunahara, R. K., Taussig, R.** (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Molecular Interventions*, 2(3), 168–184.
- Taylor, D. A., Fleming, W. W.** (2001) Unifying Perspectives of the Mechanisms Underlying the Development of Tolerance and Physical Dependence to Opioids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297(1), 11-18.
- Thompson, A. R., Ray, J. B.** (2003) The importance of opioid tolerance: a therapeutic paradox. *Journal of the American College of Surgeons*, 196(2), 321–324.

- Timmers, L., Sluijter, J. P. G., van Keulen, J. K., Hoefer, I. E., Nederhoff, M. G. J., Goumans, M.-J., Doevendans, P. A., van Echteld, C. J. A., Joles, J. A., Quax, P. H., Piek, J. J., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P. V.** (2008) Toll-like Receptor 4 Mediates Maladaptive Left Ventricular Remodeling and Impairs Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circulation Research*, 102(2), 257–264.
- Toll, L., Bruchas, M. R., Calo', G., Cox, B. M., Zaveri, N. T.** (2016) Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems. *Pharmacological Reviews*, 68(2), 419-457.
- Tomai, F., Crea, F., Gaspardone, A., Versaci, F., Ghini, A. S., Ferri, C., Desideri, G., Chiariello, L., Gioffré, P. A.** (1999) Effects of naloxone on myocardial ischemic preconditioning in humans. *Journal of the American College of Cardiology*, 33(7), 1863-1869.
- Traynor, J. R., Elliott, J.** (1993) δ -Opioid receptor subtypes and cross-talk with μ -receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 14(3), 84–86.
- Trescot, A. M., Datta, S., Lee, M., Hansen, H.** (2008) Opioid pharmacology. *Pain physician*, 11(2 Suppl), S133-S153.
- Treskatsch, S., Shaqura, M., Dehe, L., Roepke, T. K., Shakibaei, M., Schäfer, M., Mousa, S. A.** (2016) Evidence for MOR on cell membrane, sarcoplasmatic reticulum and mitochondria in left ventricular myocardium in rats. *Heart and Vessels*, 31(8), 1380-1388.
- Trigo, J. M., Martín-García, E., Berrendero, F., Robledo, P., Maldonado, R.** (2010) The endogenous opioid system: A common substrate in drug addiction. *Drug and Alcohol Dependence*, 108(3), 183–194.
- Ústav zdravotnických informací a statistiky (Česká Republika)** (2016) *Zdravotnická ročenka České republiky 2016, Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky*, Dostupné z: <http://www.uzis.cz/katalog/rocenky/zdravotnicka-rocenka-ceske-republiky-1961-az-2013> (22. 2. 2018).

Vander Heide, R. S. (2002) Increased expression of HSP27 protects canine myocytes from simulated ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 282(3), H935–H941.

Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., Babu, M. M. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 494(7436), 185–194.

Villemagne, P. S., Dannals, R. F., Ravert, H. T., Frost, J. J. (2002) PET imaging of human cardiac opioid receptors. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 29(10), 1385–1388.

Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G.-J. (2002) Role of dopamine in drug reinforcement and addiction in humans: results from imaging studies. *Behavioural Pharmacology*, 13(5–6), 355–366.

Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G.-J. (2003) The addicted human brain: insights from imaging studies. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(10), 1444–1451.

de Waha, S., Eitel, I., Desch, S., Fuernau, G., Lurz, P., Urban, D., Schuler, G., Thiele, H. (2015) Intravenous morphine administration and reperfusion success in ST-elevation myocardial infarction: insights from cardiac magnetic resonance imaging. *Clinical Research in Cardiology*, 104(9), 727–734.

Waldhoer, M., Bartlett, S. E., Whistler, J. L. (2004) Opioid Receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 953–990.

Wang, C., Qiu, T., Yang, D., Yuan, B., Han, F., Li, L., Gu, N. (2017) Endomorphin-2 analogs with C-terminal esterification produce potent systemic antinociception with reduced tolerance and gastrointestinal side effects. *Neuropharmacology*, 116, 98–109.

Wang, T.-L., Hung, C.-R. (2003) Enhanced endothelin-1 degradation by intravenous morphine in patients with congestive heart failure: role of neutral endopeptidase 24.11. *Heart*, 89(2), 211–212.

- Wang, T.-L., Chang, H.** (2001) Intravenous morphine reduces plasma endothelin 1 concentration through activation of neutral endopeptidase 24.11 in patients with myocardial infarction. *Annals of Emergency Medicine*, 37(5), 445–449.
- Wang, T. L., Chang, H., Hung, C. R., Tseng, Y. Z.** (1997) Attenuation of neutrophil and endothelial activation by intravenous morphine in patients with acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*, 80(12), 1532–1535.
- Wang, T. L., Chang, H., Hung, C.-R., Tseng, Y.-Z.** (1998) Morphine preconditioning attenuates neutrophil activation in rat models of myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 40(3), 557–563.
- Wang, X., Loram, L. C., Ramos, K., de Jesus, A. J., Thomas, J., Cheng, K., Reddy, A., Somogyi, A. A., Hutchinson, M. R., Watkins, L. R., Yin, H.** (2012) Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6325–6330.
- Wang, X., Osinska, H., Gerdes, A. M., Robbins, J.** (2002) Desmin filaments and cardiac disease: establishing causality. *Journal of Cardiac Failure*, 8(6), S287-S292.
- Wang, Y.-X., Gao, D., Pettus, M., Phillips, C., Bowersox, S. S.** (2000) Interactions of intrathecally administered ziconotide, a selective blocker of neuronal N-type voltage-sensitive calcium channels, with morphine on nociception in rats. *Pain*, 84(2–3), 271-281.
- Way, K. J., Chou, E., King, G. L.** (2000) Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(5), 181–187.
- World Health Organization** (2017) Cardiovascular diseases (CVDs). Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (21. 2. 2018).
- Williams-Pritchard, G., Headrick, J. P., Peart, J. N.** (2011) Myocardial opioid receptors in conditioning and cytoprotection. *Pharmaceuticals*, 4(12), 470–484.
- Williams, J. T., Christie, M. J., Manzoni, O.** (2001) Cellular and Synaptic Adaptations Mediating Opioid Dependence. *Physiological Reviews*, 81(1), 299-343.

Wilson, A. M., Soignier, R. D., Zadina, J. E., Kastin, A. J., Nores, W. L., Olson, R. D., Olson, G. A. (2000) Dissociation of analgesic and rewarding effects of endomorphin-1 in rats. *Peptides*, 21(12), 1871–1874.

Wilson, S. P., Klein, R. L., Chang, K.-J., Gasparis, M. S., Viveros, O. H., Yang, W.-H. (1980) Are opioid peptides co-transmitters in noradrenergic vesicles of sympathetic nerves? *Nature*, 288(5792), 707–709.

Wittert, G., Hope, P., Pyle, D. (1996) Tissue Distribution of Opioid Receptor Gene Expression in the Rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218(3), 877–881.

Wollemann, M., Benyhe, S., Simon, J. (1993) The kappa-opioid receptor: Evidence for the different subtypes. *Life Sciences*, 52(7), 599–611.

Wong, G. T., Ling Ling, J., Irwin, M. G. (2010) Activation of Central Opioid Receptors Induces Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesia & Analgesia*, 111(1), 24–28.

Wong, G. T., Lu, Y., Mei, B., Xia, Z., Irwin, M. G. (2012a) Cardioprotection from remote preconditioning involves spinal opioid receptor activation. *Life Sciences*, 91(17-18), 860–865.

Wong, G. T., Yao, L., Xia, Z., Irwin, M. G. (2012b) Intrathecal Morphine Remotely Preconditions the Heart Via a Neural Pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 60(2), 172–178.

Xi, J., Tian, W., Zhang, L., Jin, Y., Xu, Z. (2010) Morphine prevents the mitochondrial permeability transition pore opening through NO/cGMP/PKG/Zn²⁺/GSK-3 β signal pathway in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 298(2), H601-H607.

Xiao, R. P., Pepe, S., Spurgeon, H. A., Capogrossi, M. C., Lakatta, E. G. (1997) Opioid peptide receptor stimulation reverses beta-adrenergic effects in rat heart cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 272(2), H797–H805.

- Xie, N., Gomes, F. P., Deora, V., Gregory, K., Vithanage, T., Nassar, Z. D., Cabot, P. J., Sturgess, D., Shaw, P. N., Parat, M.-O.** (2017) Activation of μ -opioid receptor and Toll-like receptor 4 by plasma from morphine-treated mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 61, 244–258.
- Xu, J., Tian, W., Cui, S., Li, N., Xu, Z.** (2012) Morphine prevents oxidant stress-induced mitochondrial damage via an EGFR-TK-ROS-Akt mitochondrial signalling pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *Heart*, 98:E19.
- Xu, J., Tian, W., Ma, X., Guo, J., Shi, Q., Jin, Y., Xi, J., Xu, Z.** (2011) The molecular mechanism underlying morphine-induced Akt activation: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 61(2), 303–311.
- Yao, L., Wong, G. T. C., Xia, Z., Irwin, M. G.** (2011) Interaction between spinal opioid and adenosine receptors in remote cardiac preconditioning: effect of intrathecal morphine. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 25(3), 444–448.
- Yellon, D. M., Hausenloy, D. J.** (2007) Myocardial Reperfusion Injury. *New England Journal of Medicine*, 357(11), 1121–1135.
- Yoshimura, H., Îda, S., Oguri, K., Tsukamoto, H.** (1973) Biochemical basis for analgesic activity of morphine-6-glucuronide—I. *Biochemical Pharmacology*, 22(12), 1423–1430.
- Yu, Z., Luo, H., Fu, W., Mattson, M. P.** (1999) The Endoplasmic Reticulum Stress-Responsive Protein GRP78 Protects Neurons Against Excitotoxicity and Apoptosis: Suppression of Oxidative Stress and Stabilization of Calcium Homeostasis. *Experimental Neurology*, 155(2), 302–314.
- Yue, X., Varga, E. V., Stropova, D., Vanderah, T. W., Yamamura, H. I., Roeske, W. R.** (2006) Chronic morphine-mediated adenylyl cyclase superactivation is attenuated by the Raf-1 inhibitor, GW5074. *European Journal of Pharmacology*, 540(1–3), 57–59.
- Zadina, J. E., Hackler, L., Ge, L.-J., Kastin, A. J.** (1997) A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature*, 386(6624), 499–502.

- Zadina, J. E., Nilges, M. R., Morgenweck, J., Zhang, X., Hackler, L., Fasold, M. B.** (2016) Endomorphin analog analgesics with reduced abuse liability, respiratory depression, motor impairment, tolerance, and glial activation relative to morphine. *Neuropharmacology*, 105, 215–227.
- Zahn, P. K., Gysbers, D., Brennan, T. J.** (1997) Effect of systemic and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology*, 86(5), 1066–1077.
- Zhang, H. Y., McPherson, B. C., Liu, H., Baman, T., McPherson, S. S., Rock, P., Yao, Z.** (2002) Role of nitric-oxide synthase, free radicals, and protein kinase C delta in opioid-induced cardioprotection. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), 1012–1019.
- Zhang, R., Shen, L., Xie, Y., Gen, L., Li, X., Ji, Q.** (2013) Effect of morphine-induced postconditioning in corrections of tetralogy of fallot. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 8:76.
- Zhang, Y., Gu, E., Zhang, J., Chen, Z.** (2007) Role of p38 mitogen-activated protein kinases in cardioprotection of morphine preconditioning. *Chinese Medical Journal*, 120(9), 777–781.
- Zhang, Y., Irwin, M. G., Lu, Y., Mei, B., Zuo, Y.-M., Chen, Z., Wong, T.-M.** (2011) Intracerebroventricular administration of morphine confers remote cardioprotection – Role of opioid receptors and calmodulin. *European Journal of Pharmacology*, 656(1–3), 74–80.
- Zhang, Y., Xing, F., Zheng, H., Xi, J., Cui, X., Xu, Z.** (2013) Roles of mitochondrial Src tyrosine kinase and zinc in nitric oxide-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *Free Radical Research*, 47(6–7), 517–525.
- Zhang, Z., Xin, S.-M., Wu, G.-X., Zhang, W.-B., Ma, L., Pei, G.** (1999) Endogenous δ -Opioid and ORL1 Receptors Couple to Phosphorylation and Activation of p38 MAPK in NG108-15 Cells and This Is Regulated by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Journal of Neurochemistry*, 73(4), 1502–1509.

Zhao, Y.-L., Chen, S.-R., Chen, H., Pan, H.-L. (2012) Chronic opioid potentiates presynaptic but impairs postsynaptic N-methyl-D-aspartic acid receptor activity in spinal cords: implications for opioid hyperalgesia and tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(30), 25073–25085.

Zhu, H.-J., Han, Z.-Y., He, S.-F., Jin, S.-Y., Xu, S.-J., Fang, X.-D., Zhang, Y. (2017) Specific MicroRNAs comparisons in hypoxia and morphine preconditioning against hypoxia-reoxygenation injury with and without heart failure. *Life Sciences*, 170, 82–92.

Zöllner, C., Stein, C. (2006) Opioids, *Analgesia, Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, Berlin, Heidelberg, 177, 31–63.

10. Přílohy - Seznam publikací *in extenso*

10. 1. Příloha A

Skrabalova, J., Neckar, J., Hejnova, L., Bartonova, I., Kolar, F., Novotny, J. (2012) Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenylyl cyclase signaling in rats. *Pharmacological Reports*, 64, 351-359.

10. 2. Příloha B

Drastichova, Z., **Skrabalova, J.**, Neckar, J., Kolar, F., Novotny, J. (2011) Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium. *Journal of Biomedical Science*, 18:89.

10. 3. Příloha C

Drastichova, Z., **Skrabalova, J.**, Jedelsky, P., Neckar, J., Kolar, F., Novotny, J. (2012) Global changes in the rat heart proteome induced by prolonged morphine treatment and withdrawal. *PLoS One*, 7(10): e47167.

10. 4. Příloha D

Skrabalova, J., Karlovska, I., Hejnova, L., Novotny, J. (2018) Protective effect of morphine against the oxidant-induced injury in H9c2 cells. *Cardiovascular Toxicology*, 18(4), 374-385.

10. 2. Příloha A

Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenylyl cyclase signaling in rats

2012

Pharmacological Reports

64, 351-359

Skrabalova, J., Neckar, J., Hejnova, L., Bartonova, I., Kolar, F., Novotny, J.



Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenylyl cyclase signaling in rats

Jitka Skrabalova¹, Jan Neckar^{2,3}, Lucie Hejnova¹, Iveta Bartonova¹,
Frantisek Kolar^{2,3}, Jiri Novotny¹

¹Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Vinicna 7, 128 44 Prague, Czech Republic

²Department of Developmental Cardiology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

³Centre for Cardiovascular Research, Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

Correspondence: Jiri Novotny, e-mail: novotnj99@natur.cuni.cz

Abstract:

Background: Morphine is often administered to patients for pain management, but it is also recommended to ameliorate some types of cardiovascular diseases. Nevertheless, there is a lack of information regarding the effect of prolonged morphine treatment on myocardial adenylyl cyclase (AC) signaling, which plays an important role in regulating heart function.

Method: The present work has investigated the consequences of 10-day administration of high morphine doses (10 mg/kg per day) to adult Wistar rats for functioning of the G-protein-mediated AC signaling system.

Results: Morphine treatment appreciably affected neither the number of myocardial β -adrenoceptors nor the content of selected subunits of trimeric G-proteins ($G_s\alpha$, $G_{i/o}\alpha$, $G_z\alpha$, $G_{q/11}\alpha$ and $G\beta$) but the amount of the dominant myocardial AC isoform V/VI almost doubled. These alterations were accompanied by a marked AC supersensitization: the enzyme activity stimulated by manganese, fluoride, forskolin or isoproterenol was considerably increased (by about 50–100%). In contrast, the ability of opioid agonists to inhibit forskolin-stimulated AC activity was slightly but significantly decreased in both groups. Besides that, morphine markedly decreased the incidence of ischemic ventricular arrhythmias induced by coronary artery occlusion, but did not significantly influence infarct size and arrhythmias occurring during reperfusion.

Conclusion: Overall, these results indicate that prolonged treatment of rats with high doses of morphine substantially alters the function of myocardial G-protein-regulated AC signaling. These alterations are accompanied by a reduced susceptibility to ischemia-induced ventricular arrhythmias.

Key words:

rat myocardium, morphine, adenylyl cyclase, G-proteins, arrhythmias

Introduction

Morphine is well known for its ability to exert significant cardiovascular effects. However, a number of controversial data have been published about its fa-

vorable or adverse effects on the heart. This drug can apparently induce increased parasympathetic activity and suppress cardiovascular functions [32, 45]. Prolonged morphine administration and subsequent withdrawal can affect catecholamine turnover and thus

myocardial adrenergic signaling and function [15, 44]. Morphine can block reuptake of norepinephrine resulting in cardiotoxic effects [4]. It might be important to differentiate between the consequences of short- and long-term morphine application. Markiewicz and colleagues showed that one-shot administration of morphine to rats prior to a permanent coronary artery occlusion produced a statistically significant increase in infarct size [25]. In contrast, morphine given by three 5-min infusions was able to mimic the beneficial effect of preconditioning in open-chest rats subjected to myocardial ischemia and reperfusion [50]. Since then, several studies have been published that confirm a role of opioid receptors in morphine-induced acute and delayed preconditioning [9, 11, 17, 19, 27, 39, 48, 55]. In addition, cardioprotective effect of chronic morphine exposure has been also observed in a mouse model of myocardial infarction [40, 41].

Morphine can induce changes at the receptor level as well as in some other proteins engaged in signaling pathways initiated by opioid receptors and regulated by their cognate trimeric G-proteins [10, 23]. Whereas acute opioid action is characterized by diminution of intracellular cAMP levels (through the inhibitory effect of $G_{i/o}$ proteins on adenylyl cyclase (AC)), sustained opioid treatment may increase AC activity [53]. Heterologous sensitization of the AC signaling cascade, termed AC supersensitivity, was first described in studies aiming to explain the development of tolerance and withdrawal syndrome, which can occur after chronic opioid exposure [21, 34]. The majority of studies addressing the effects of morphine on AC signaling were done on samples of brain tissue obtained from laboratory animals [5, 20, 47], but changes in AC activity (superactivation or superinhibition) caused by sustained morphine treatment were also observed in cell cultures [49, 51]. Surprisingly, only little attention has so far been paid to the possible interference of morphine with the myocardial AC signaling system. To the best of our knowledge, there is only one report concerning this issue. Napier and colleagues observed that chronic administration of morphine increased expression of $G_i\alpha$ and $G_s\alpha$ proteins in the dog heart, but they did not find any significant change in the enzyme activity of AC [32].

In the present work, we have studied the presumed effect on myocardial AC signaling of sustained administration of morphine in high doses to rats. Parallel experiments have been conducted to find out whether this morphine exposure may have some cardioprotective potential.

Materials and Methods

Materials

[3 H]CGP-12177 was purchased from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) and scintillation cocktail CytoScint from ICN Biomedicals (Irvine, CA, USA). Nitrocellulose membrane was purchased from Schleicher-Schuell (Erdmannhausen, Germany) and Whatman GF/C filters from Whatman Ltd. (Oxford, UK). Acrylamide and bis-acrylamide were from SERVA (Heidelberg, Germany). All other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO, USA) and they were of the highest purity available.

Experimental model

Animal experiments were conducted in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, 1996) and they were approved by local institutional animal care and use committee. Male Wistar rats kept under standard laboratory conditions with free access to water and a standard pellet diet were given intramuscular morphine (10 mg/kg per day, ~300 μ l) for 10 days. Control animals were injected with sterile normal saline (0.9% NaCl). The animals designated for biochemical analysis were killed by decapitation one day after the last morphine dose. The hearts were rapidly excised, divided into left and right ventricles, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Myocardial membrane preparation

Frozen samples of left ventricular (LV) myocardium were placed into 10 volumes of ice-cold homogenization buffer (20 mM Tris, 3 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA and 0.25 M sucrose; pH 7.4) containing the protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), cut in small pieces and homogenized in an Ultra-Turrax blender (15 s). The resulting suspension was further homogenized for 1 min in a glass homogenizer with a motor-driven Teflon pestle, and then centrifuged at $600 \times g$ for 10 min at 4°C in order to remove large tissue debris and nuclear fragments. A portion of the resulting postnuclear supernatant (PNS) was centrifuged at $50,000 \times g$ for 30 min in order to isolate crude membranes. The pellet containing

crude membranes was resuspended in TME buffer (20 mM Tris, 3 mM MgCl₂, and 1 mM EDTA; pH 7.4) and frozen in aliquots at -80°C. Another portion of PNS was applied on the top of 18% Percoll solution in homogenization buffer and centrifuged at 60,000 × g for 15 min. In this way, two layers containing opaque material were separated on the gradient. The upper layer enriched in plasma membranes was diluted in TME buffer and centrifuged at 150,000 × g for 1 h. Membrane pellet was then resuspended in TME buffer, snap-frozen in liquid nitrogen and stored in aliquots at -80°C until use.

β-Adrenoceptor binding

Myocardial β-adrenoceptors (β-ARs) were determined by radioligand binding assay with the β-antagonist [³H]CGP-12177 as described previously [37]. Assay mixtures in a final volume of 0.5 ml contained 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 1 mM ascorbic acid, 100 μg of myocardial membrane protein and 4 nM [³H]CGP-12177 (38 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL, USA). The binding mixture was incubated for 2 h at 37°C; at this time, the specific binding of radioligand had attained an equilibrium. The binding reaction was terminated by adding 3 ml of ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl₂ and subsequent filtration through GF/C filters presoaked for 1 h with polyethylenimine. The filters were then washed twice with 3 ml of ice-cold Tris-HCl buffer, dried, and placed into scintillation vials. After addition of 4 ml scintillation cocktail CytoScint, radioactivity retained on the filters was measured by counting for 5 min. Nonspecific binding was defined as that not displaceable by 10 μM (S)-(-)-propranolol.

Electrophoresis and immunoblotting

Samples of myocardial membranes were solubilized in Laemmli buffer and loaded (30 μg per lane) on standard 10% acrylamide gels for SDS-PAGE. After electrophoresis, the resolved proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell), blocked with 3% non-fat dry milk in TBS buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 8.0) for 1 h and then incubated with relevant primary antibodies overnight at 4°C. After three 10-min washes in TBS containing 0.3% Tween 20, the secondary goat anti-rabbit IgG labeled with horseradish peroxidase was applied for 1 h

at room temperature. After another three 10-min washes in TBS-Tween, the blots were visualized by enhanced chemiluminescence technique according to the manufacturer's instructions (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). The immunoblots were scanned and quantitatively analyzed by ImageQuantTM TL software (Amersham Biosciences).

Determination of AC activity

AC activity was assayed in 100 μl of reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 0.8 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.4 mM ATP, 50 U/ml pyruvate kinase, 10 mM potassium phosphoenolpyruvate, 160 μg/ml BSA, 0.2 mM isobutylmethylxanthine, 10 μM GTP, and different stimulators (50 μM forskolin, 10 mM NaF, or 10 μM (-)-isoproterenol). The assay was run for 20 min at 30°C and the reaction was then terminated by adding 0.2 ml of 0.15 M HCl and cooling on ice. The amount of cAMP product in each assay tube was determined using a commercial cAMP EIA kit (NewEast Biosciences; Malvern, PA, USA) according to the manufacturer's instructions. A standard curve was utilized to express data in pmol of cAMP per mg of protein per min.

Myocardial ischemia/reperfusion

Susceptibility to ventricular arrhythmias and myocardial infarction of control and morphine-treated rats was evaluated the next day after the last morphine dose in anesthetized (sodium pentobarbital; 60 mg/kg body weight) open-chest pump-ventilated (69 strokes/min, tidal volume of 12 ml/kg body weight) animals subjected to ischemia/reperfusion insult. A single-lead electrocardiogram (ECG) and blood pressure in the carotid artery were continually recorded. Left thoracotomy was performed and a silk braided suture 5/0 (Chirmax, Czech Republic) was placed around the left anterior descending (LAD) coronary artery about 1–2 mm distal to its origin. After 10-min stabilization, regional myocardial ischemia was induced by the tightening of the suture threaded through a polyethylene tube. After a 20-min occlusion period, the ligature was released and reperfusion of previously ischemic tissue continued. After 5 min of reperfusion chest was closed, air from thorax was exhausted and spontaneously breathing animals were maintained in deep anesthesia following 3 h.

Assessment of arrhythmias

The incidence and severity of arrhythmias during the ischemic insult and in the first 5 min of reperfusion were assessed according to the Lambeth Conventions [52]. Premature ventricular complexes (PVCs) occurring as singles, salvos or tachycardia (a run of 4 or more consecutive PVCs) were counted separately. The incidence of ventricular tachycardia (VT) and fibrillation (VF) was also evaluated. VF lasting more than two minutes was considered as sustained (VFs); hearts exhibiting VFs were excluded from further evaluation. The severity of arrhythmias in each individual heart was evaluated by means of a 5-point arrhythmia score: single PVCs were given a score of 1, salvos a score of 2, VT a score of 3, reversible VF a score of 4, and VFs a score of 5. An assigned number corresponded to the most severe type of arrhythmias observed in that heart. Scores were used for group analysis of severity of arrhythmias.

Assessment of myocardial infarction

The hearts were excised and washed with saline through the aorta. The area at risk was delineated by perfusion with 5% potassium permanganate (after coronary artery occlusion). Frozen hearts were cut into slices 1 mm thick, incubated with 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (phosphate buffer pH 7.4, 37°C) for 30 min to stain viable myocardium, and fixed in formaldehyde solution. Four days after the staining, both sides of the slices were photographed. The sizes of the infarct area (IA), the area at risk (AR) and the left ventricles (LV) were determined by computerized planimetry. The size of IA was normalized to the AR (IA/AR) and the size of AR was normalized to the LV (AR/LV).

Data analysis

All results were expressed as the mean \pm SEM. Biochemical data were determined in at least three independent preparations. Effect of morphine on parameters with normal distribution was analyzed by one-way ANOVA, and group-to-group comparisons were done using unpaired Student's *t*-test. Differences in the number of PVCs between the groups were compared by the Kruskal-Wallis non-parametric test. The incidence of tachycardia and fibrillation was examined by Fischer's exact test. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

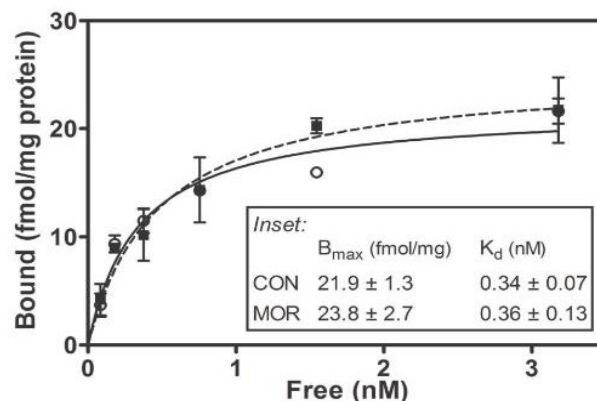


Fig. 1. Representative saturation binding curves demonstrating [3 H]CGP-12177 binding to myocardial membranes from control (CON, open symbols) and morphine-treated (MOR, closed symbols) rats. *Inset:* β -Adrenoceptor binding parameters (B_{max} and K_d) calculated by nonlinear regression using Prism 5 software (GraphPad). Data points are the mean of triplicate determinations

Results

Body and heart weight parameters

Body weight (control: 305 ± 13 g, morphine: 290 ± 14 g), heart weight (control: 697 ± 40 mg, morphine: 665 ± 40 mg) and heart-to-body weight ratio (control: 2.290, morphine: 2.296 ± 0.031) did not significantly differ between animals treated for 10 days with morphine (10 mg/kg per day) and the corresponding controls ($n = 11$ in each group).

β -Adrenoceptors

Saturation binding experiments with [3 H]CGP-12177 performed on myocardial membranes indicated that the levels of β -ARs were similar (about 23 fmol/mg protein) in preparations from control and morphine-treated rats (Fig. 1). The apparent dissociation constants (K_D) were about 0.35 nM and they did not differ significantly between the two groups.

Expression of G-proteins and AC

Selected G-protein subunits and isoforms of AC in myocardial preparations were assessed by western blotting using specific antisera (Fig. 2). Whereas there

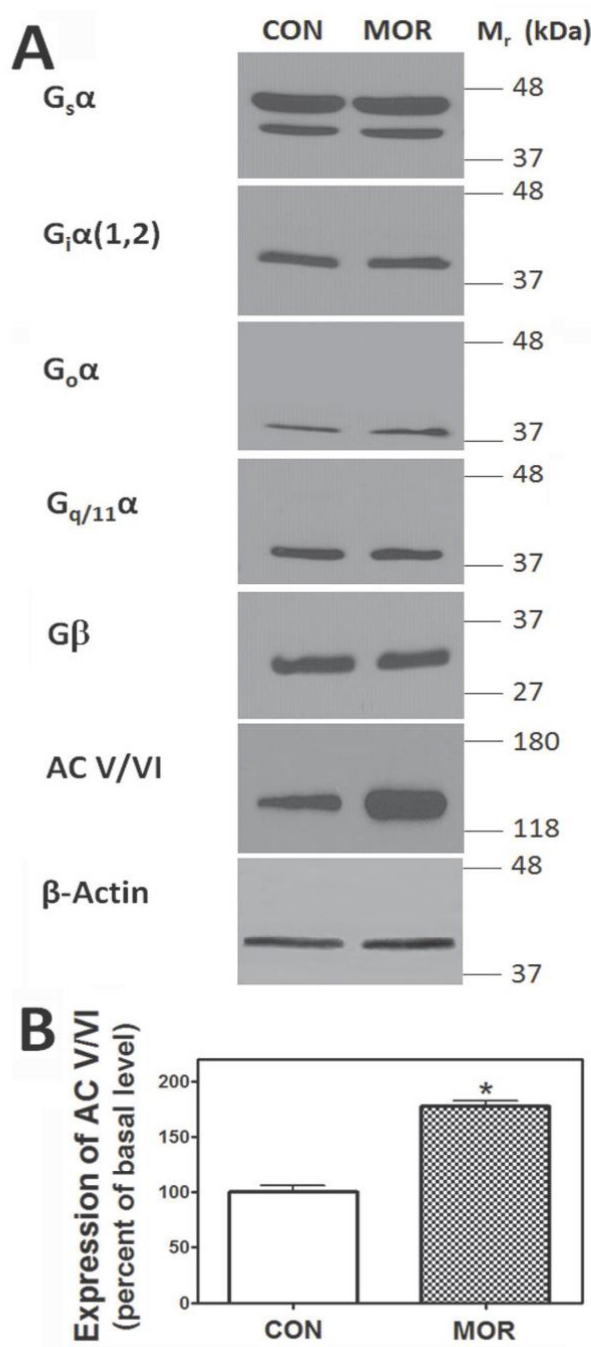


Fig. 2. Immunoblot analysis of selected G-proteins and adenylyl cyclase in myocardial preparations from control (CON) and morphine-treated (MOR) rats. **(A)** Samples (30 µg in each lane) were resolved on SDS-PAGE, electrotransferred to nitrocellulose membrane and probed with antibodies selective for G_sα, G_iα(1,2), G_oα, G_{q/11}α, Gβ and AC V/VI. β-Actin was used as a control to ensure equal loading. One representative blot is shown out of three separate experiments. **(B)** ECL signals were quantified by densitometry and expressed as a percentage of the values obtained in myocardial preparations from control animals (100%). The bar chart shown here displays the data of significantly altered AC V/VI (* *p* ≤ 0.001)

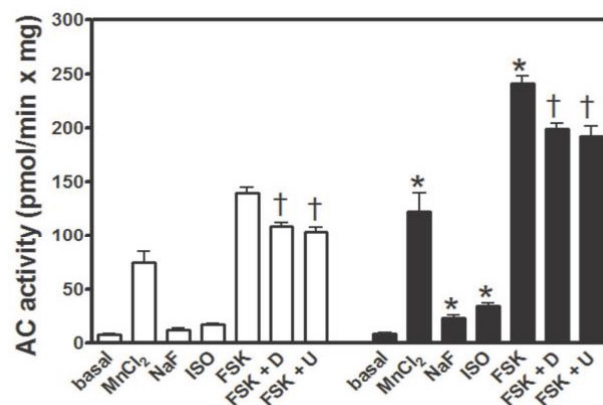


Fig. 3. Effect of prolonged morphine exposure on adenylyl cyclase activity in myocardial membranes. AC activity was determined in samples from control (CON, empty bars) and morphine-treated (MOR, closed bars) rats using the following stimulators: manganese (MnCl₂), forskolin (FSK), fluoride (NaF), and isoproterenol (ISO). Inhibition of forskolin-stimulated AC activity by 10 µM DADLE (D, δ-opioid receptor agonist) and 10 µM U-50488 (U, κ-opioid receptor agonist) was assessed in control and morphine-treated rats. Values are the means ± SEM of three independent measurements performed in duplicates. * *p* ≤ 0.05 vs. control group, † *p* ≤ 0.05 vs. respective FSK-stimulated AC activity

were no significant differences in the amount of G_sα, G_{i/o}α, G_zα, G_{q/11}α and Gβ in samples from control and morphine-treated rats, AC V/VI doubled after morphine treatment.

AC activity

In order to evaluate the presumed effect of morphine on functional status of the myocardial AC signaling system, activity of AC was determined under various experimental conditions. Whereas basal activity of AC was not significantly changed, the activity measured under various stimulation conditions (fluoride, manganese, forskolin or isoproterenol) was markedly increased (by about 50–100%) in preparations from morphine-treated rats as compared to those from corresponding age-matched control animals (Fig. 3). This observation apparently reflects AC supersensitization elicited by sustained morphine treatment. Subsequent assessment of the ability of opioid agonists to inhibit forskolin-stimulated AC revealed that DADLE (agonist of δ-OR) and U-50488 (agonist of κ-OR) inhibited the enzyme activity in myocardial preparations from morphine-treated rats by about 18% but in those from the corresponding controls by about 25% (Fig. 3). A significantly reduced ability of opioid ago-

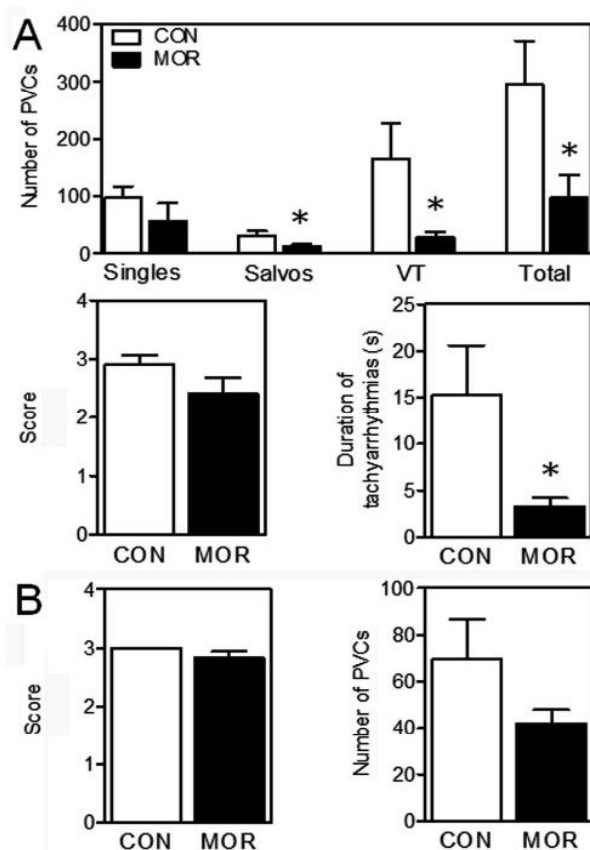


Fig. 4. Effect of prolonged morphine exposure on ischemic and early reperfusion ventricular arrhythmias. Premature ventricular complexes (PVCs) occurring as singles, salvos, tachycardia (VT), total number of PVCs, score and duration of tachyarrhythmias were assessed during 20-min ischemia (**A**) and the first 5 min of reperfusion (**B**) in control (CON, empty bars) and morphine-treated (MOR, closed bars) rats. Values are the means \pm SEM of 11 hearts per group; * $p \leq 0.05$ vs. control group

nists to inhibit AC activity indicates at least a partial desensitization of the inhibitory arm of the AC signaling complex upon prolonged morphine treatment.

Incidence of ventricular arrhythmias and infarct size

A comparison between the incidence of arrhythmias occurring during ischemia and in the early reperfusion phase in control and morphine-exposed rats is given in Figure 4. Prolonged morphine treatment markedly reduced the number of PVCs occurring as salvos or VT and lowered the duration of tachyarrhythmias evoked by myocardial ischemia (Fig. 4A). The incidence of VF in control animals was 22% (one rat exhibited VFs and one

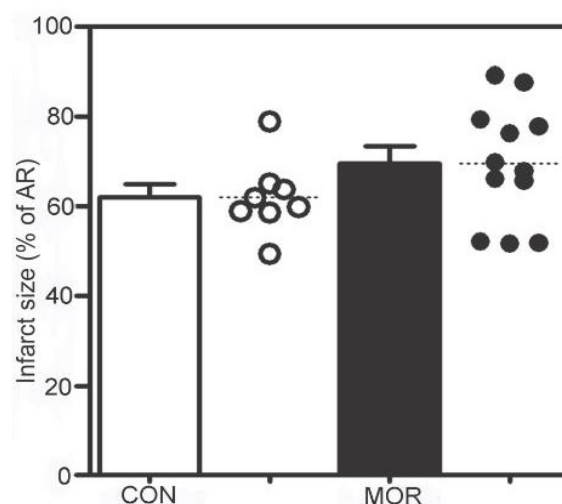


Fig. 5. Myocardial infarct size normalized to the area at risk (AR) in control (CON, empty bars) and morphine-treated (MOR, closed bars) rats. Values are the means \pm SEM of 8 and 12 hearts per group

reversible VF), while no VF was observed in the group of rats treated with morphine. On the other hand, no difference was found in the incidence of ventricular arrhythmias between the two groups of animals during the early reperfusion period (Fig. 4B).

The normalized area at risk did not differ between the groups (30.8 ± 3.0 and 31.0 ± 2.3). Assessment of myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion did not reveal any significant effect of morphine on the infarct size (Fig. 5).

Discussion

It is well known that morphine can affect transmembrane signaling mediated by trimeric G-proteins, including AC activity. However, most of these data have so far been obtained from *in vitro* studies [3, 7, 16, 54] and there is a lack of data concerning the myocardial AC signaling system during chronic opioid treatment.

There are some indications that long-term opioid exposure may modulate β -AR functions in both central nervous system and myocardium [1, 22]. In the nervous system, a certain increase was usually observed in β -AR density after chronic morphine administration [26, 29, 30]. However, there is no information

regarding the effect of morphine on myocardial β -ARs. Therefore, we assessed β -ARs in myocardial preparations from both control and morphine-treated rats. Our finding that prolonged morphine treatment affected neither density nor affinity of myocardial β -ARs conforms well with the earlier report describing no changes in cerebral ARs in morphine-dependent animals [28].

Our subsequent analyses focused on the distribution of trimeric G-proteins did not reveal any significant changes in the content of $G_s\alpha$, $G_{i/o}\alpha$, $G_z\alpha$, $G_{q/11}\alpha$ and $G\beta$ subunits in rat hearts after prolonged morphine treatment. So far, discordant results have been published concerning the effect of morphine on the expression of G-proteins. Prolonged morphine administration led to changes of G-protein subunit levels in the CNS but there are some discrepancies concerning the specific regions where these changes have been detected. Either decrease, or increase or no change was observed in the content of $G_s\alpha$ and $G_{i/o}\alpha$ in different brain areas after chronic morphine treatment [6, 8, 35, 38, 43]. Besides that, no significant change was found in the levels of $G_z\alpha$ or $G\beta$ [6, 13, 18, 31, 33]. In these *in vivo* experiments, morphine was usually administered in similar doses as in our present study (about 10–50 mg/kg per day, 1–2 weeks). Interestingly, prolonged morphine treatment of human neuroblastoma SH-SY5Y cells (10 μ M; 3 days) resulted in up-regulation of various G-protein subunits [2]. More relevant to the present study, long-term continuous administration of morphine (5.75 mg/kg per day, 2 weeks) increased expression of $G_i\alpha$ and $G_s\alpha$ in the dog heart [32]. Some of the observed differences and incongruities may be due to the experimental models, the regimes of morphine administration, and to the assay methods utilized.

It has been previously reported that prolonged morphine treatment may lead to up-regulation of some isoforms of AC in rat brain and guinea pig longitudinal muscle/myenteric plexus [13, 46]. Our present finding of markedly increased level of myocardial AC V/VI in samples from morphine-treated rats is in line with these observations. The increased expression of AC may contribute to the enzyme superactivation. Accordingly, AC activity stimulated either directly or indirectly (*via* β -ARs and/or G_s protein) was markedly higher in preparations from morphine-treated animals than in the corresponding controls. AC superactivation as a consequence of chronic opioid treatment has been previously described in *in vitro* cell

cultures, as well as in peritoneal macrophages and distinct brain regions [12, 24, 54]. Interestingly, Napier and co-workers [32] failed to detect any significant changes in myocardial AC activity after chronic morphine administration to dogs. The discrepancy between these and our results can most likely be attributed to different animal models and experimental conditions.

Our finding of lower incidence of ischemic ventricular arrhythmias in morphine-treated rats suggests that this drug can be implicated in the acquisition of antiarrhythmic protection. Similar antiarrhythmic effect of morphine was observed in rats that were administered the drug (about 20 mg per day) *via* drinking water for 3 weeks [14]. This also conforms well to the results of some earlier investigations conducted on other models. It is well known that morphine can mediate acute or delayed preconditioning-like effects [19, 48]. Moreover, Peart and co-workers [41] have recently described a profound cardioprotective phenotype in mice that was afforded by prolonged continuous exposure to morphine (75-mg subcutaneous pellet; 5 days). Intriguingly, we did not see any protective effect of morphine against lethal myocardial injury induced by ischemia/reperfusion as indicated by unchanged infarct size. Similarly, the occurrence and severity of reperfusion arrhythmias was not affected by morphine treatment. These data suggest that the cardioprotective effects of morphine are strongly dependent on the concrete experimental conditions and the endpoint of injury.

Overall, results of the present work indicate that prolonged treatment of rats with high doses of morphine substantially alters the function of myocardial AC signaling and that up-regulation of the cAMP pathway is not caused by changes in G-protein expression. It is unclear whether these changes may be related to the reduced susceptibility to ischemia-induced ventricular arrhythmias. It is known that abnormalities in intracellular Ca^{2+} handling can profoundly disrupt the electrophysiological properties of the heart and lead to arrhythmias [42]. Crucial Ca^{2+} handling proteins, such as ryanodine receptors and phospholamban, are regulated through phosphorylation by PKA, the best known downstream effector of the AC signaling pathway [36]. Therefore, attention should be paid to the role of the AC signaling in future research focused on elucidating molecular mechanisms of potential antiarrhythmic effect of chronic morphine treatment.

Acknowledgments:

This work was supported by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (IAA501110901), the Charles University Grant Agency (429511), and the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic (MSM0021620858).

References:

1. Ackerman JM, Womble MD, Moises HC: Multiple effects of long-term morphine treatment on postsynaptic β -adrenergic receptor function in hippocampus: an intracellular analysis. *Brain Res*, 1994, 656, 309–318.
2. Ammer H, Schulz R: Alterations in the expression of G-proteins and regulation of adenylyl cyclase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells chronically exposed to low-efficacy μ -opioids. *Biochem J*, 1993, 295, 263–271.
3. Ammer H, Schulz R: Opioid tolerance/dependence in neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells is associated with a reduction in spontaneous stimulatory receptor activity. *FEBS Lett*, 2000, 485, 157–162.
4. Berton O, Nestler EJ: New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7, 137–151.
5. Bie B, Peng Y, Zhang Y, Pan ZZ: cAMP-mediated mechanisms for pain sensitization during opioid withdrawal. *J Neurosci*, 2005, 25, 3824–3832.
6. Bourova L, Vosahlikova M, Kagan D, Dlouha K, Novotny J, Svoboda P: Long-term adaptation to high doses of morphine causes desensitization of μ -OR- and δ -OR-stimulated G-protein response in forebrain cortex but does not decrease the amount of G-protein α subunits. *Med Sci Monit*, 2010, 16, BR260–270.
7. Clark MJ, Traynor JR: Endogenous regulator of G protein signaling proteins reduce μ -opioid receptor desensitization and down-regulation and adenylyl cyclase tolerance in C6 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312, 809–815.
8. Fabian G, Bozo B, Szikszay M, Horvath G, Coscia CJ, Szucs M: Chronic morphine-induced changes in μ -opioid receptors and G proteins of different subcellular loci in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 302, 774–780.
9. Frassdorf J, Huhn R, Niersmann C, Weber NC, Schlack W, Preckel B, Hollmann MW: Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels. *Can J Anaesth*, 2010, 57, 767–773.
10. Gintzler AR, Chakrabarti S: Opioid tolerance and the emergence of new opioid receptor-coupled signaling. *Mol Neurobiol*, 2000, 21, 21–33.
11. Gintzler AR, Chakrabarti S: Post-opioid receptor adaptations to chronic morphine; altered functionality and associations of signaling molecules. *Life Sci*, 2006, 79, 717–722.
12. He L, Kim JA, Whistler JL: Biomarkers of morphine tolerance and dependence are prevented by morphine-induced endocytosis of a mutant μ -opioid receptor. *FASEB J*, 2009, 23, 4327–4334.
13. Chakrabarti S, Rivera M, Yan SZ, Tang WJ, Gintzler AR: Chronic morphine augments G $\beta\gamma$ /Gsa stimulation of adenylyl cyclase: relevance to opioid tolerance. *Mol Pharmacol*, 1998, 54, 655–662.
14. Chan MY, Dai S, Ko WW: Effects of morphine on cardiovascular responses to acute myocardial ischaemia in rats. *Br J Pharmacol*, 1987, 90, 537–543.
15. Chang AP, Dixon WR: Role of plasma catecholamines in eliciting cardiovascular changes seen during naloxone-precipitated withdrawal in conscious, unrestrained morphine-dependent rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990, 254, 857–863.
16. Chen Y, Liu J, Yu L: Functional coupling of a μ opioid receptor to G proteins and adenylyl cyclase: Modulation by chronic morphine treatment. *Addict Biol*, 1996, 1, 49–59.
17. Chen Z, Li T, Zhang B: Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts. *J Surg Res*, 2008, 145, 287–294.
18. Javan M, Ahmadiani A, Motamadi F, Kazemi B: Changes in G proteins genes expression in rat lumbar spinal cord support the inhibitory effect of chronic pain on the development of tolerance to morphine analgesia. *Neurosci Res*, 2005, 53, 250–256.
19. Jiang X, Shi E, Nakajima Y, Sato S: COX-2 mediates morphine-induced delayed cardioprotection via an iNOS-dependent mechanism. *Life Sci*, 2006, 78, 2543–2549.
20. Kaplan GB, Sethi RK, McClelland EG, Leite-Morris KA: Regulation of G protein-mediated adenylyl cyclase in striatum and cortex of opiate-dependent and opiate withdrawing mice. *Brain Res*, 1998, 788, 104–110.
21. Kieffer BL, Evans CJ: Opioid tolerance-in search of the holy grail. *Cell*, 2002, 108, 587–590.
22. Kindman LA, Kates RE, Ginsburg R: Opioids potentiate contractile response of rabbit myocardium to the β -adrenergic agonist isoproterenol. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991, 17, 61–67.
23. Law PY, Wong YH, Loh HH: Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, 40, 389–430.
24. Lugo-Chinchilla AM, Baez D, Velez M, Ildefonso C, Renaud FL: Altered subcellular signaling in murine peritoneal macrophages upon chronic morphine exposure. *J Neuroimmunol*, 2006, 176, 86–94.
25. Markiewicz W, Finberg JP, Lichtig C: Morphine increases myocardial infarction size in rats. *Anesth Analg*, 1982, 61, 843–846.
26. Mattio TG, Kirby ML: Effects of chronic morphine administration on catecholamines and β -adrenergic receptors of the superior cervical ganglion and iris of the rat. *Life Sci*, 1982, 30, 1435–1442.
27. McPherson BC, Yao Z: Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial K_{ATP} channels in myocytes. *Circulation*, 2001, 103, 290–295.
28. Minneman KP, Holtzman SG: Morphine dependence and withdrawal without alterations in cerebral β -adrenergic receptor density. *Biochem Pharmacol*, 1984, 33, 2331–2333.
29. Moises HC, Smith CB: Changes in cortical β -adrenergic receptor density and neuronal sensitivity to norepinephrine accompany morphine dependence and withdrawal. *Brain Res*, 1987, 400, 110–126.
30. Moises HC, Smith CB: Electrophysiological responsiveness to isoproterenol in rat hippocampal slices correlates

- with changes in β -adrenergic receptor density induced by chronic morphine treatment. *Brain Res*, 1989, 485, 67–78.
31. Nalepa I, Zelek-Molik A, Bielawski A, Roman A, Vetulani J: Does the presence of morphine counteract adaptive changes in expression of G-protein α subunits mRNA induced by chronic morphine treatment? *Pharmacol Rep*, 2007, 59, 34–45.
 32. Napier C, Stewart M, Melrose H, Hopkins B, McHarg A, Wallis R: Characterisation of the 5-HT receptor binding profile of eletriptan and kinetics of [3 H]eletriptan binding at human 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors. *Eur J Pharmacol*, 1999, 368, 259–268.
 33. Narita M, Mizuo K, Shibasaki M, Suzuki T: Up-regulation of the G $_{q/11\alpha}$ protein and protein kinase C during the development of sensitization to morphine-induced hyperlocomotion. *Neuroscience*, 2002, 111, 127–132.
 34. Nestler EJ, Berhow MT, Brodtkin ES: Molecular mechanisms of drug addiction: adaptations in signal transduction pathways. *Mol Psychiatry*, 1996, 1, 190–199.
 35. Nestler EJ, Erdoz JJ, Terwilliger R, Duman RS, Tallman JF: Regulation of G proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Brain Res*, 1989, 476, 230–239.
 36. Nichols CB, Rossow CF, Navedo MF, Westenbroek RE, Catterall WA, Santana LF, McKnight GS: Sympathetic stimulation of adult cardiomyocytes requires association of AKAP5 with a subpopulation of L-type calcium channels. *Circ Res*, 2010, 107, 747–756.
 37. Novotny J, Bourova L, Malkova O, Svoboda P, Kolar F: G proteins, β -adrenoreceptors and β -adrenergic responsiveness in immature and adult rat ventricular myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31, 761–772.
 38. Parolaro D, Rubino T, Gori E, Massi P, Bendotti C, Patrini G, Marcozzi C, Parenti M: In situ hybridization reveals specific increases in *Gas* and *Gao* mRNA in discrete brain regions of morphine-tolerant rats. *Eur J Pharmacol*, 1993, 244, 211–222.
 39. Peart JN, Gross ER, Gross GJ: Opioid-induced preconditioning: recent advances and future perspectives. *Vascul Pharmacol*, 2005, 42, 211–218.
 40. Peart JN, Gross GJ: Chronic exposure to morphine produces a marked cardioprotective phenotype in aged mouse hearts. *Exp Gerontol*, 2004, 39, 1021–1026.
 41. Peart JN, Hoe LE, Gross GJ, Headrick JP: Sustained ligand-activated preconditioning via δ -opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 336, 274–281.
 42. Priori SG, Chen SR: Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis. *Circ Res*, 2011, 108, 871–883.
 43. Przewlocka B, Lasoń W, Przewlocki R: The effect of chronic morphine and cocaine administration on the Gs and Go protein messenger RNA levels in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 1994, 63, 1111–1116.
 44. Rabadan JV, Milanes MV, Laorden ML: Effects of chronic morphine treatment on catecholamines content and mechanical response in the rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 280, 32–37.
 45. Randich A, Thurston CL, Ludwig PS, Timmerman MR, Gebhart GF: Antinociception and cardiovascular responses produced by intravenous morphine: the role of vagal afferents. *Brain Res*, 1991, 543, 256–270.
 46. Rivera M, Gintzler AR: Differential effect of chronic morphine on mRNA encoding adenylyl cyclase isoforms: relevance to physiological sequelae of tolerance/dependence. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 54, 165–169.
 47. Seo JJ, Lee JW, Lee WK, Hong JT, Lee CK, Lee MK, Oh KW: Inhibitory effects of ginseng total saponin on up-regulation of cAMP pathway induced by repeated administration of morphine. *Arch Pharm Res*, 2008, 31, 167–170.
 48. Shi E, Jiang X, Bai H, Gu T, Chang Y, Wang J: Cardioprotective effects of morphine on rat heart suffering from ischemia and reperfusion. *Chin Med J (Engl)*, 2003, 116, 1059–1062.
 49. Schallmach E, Steiner D, Vogel Z: Adenylyl cyclase type II activity is regulated by two different mechanisms: implications for acute and chronic opioid exposure. *Neuropharmacology*, 2006, 50, 998–1005.
 50. Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ: Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res*, 1996, 78, 1100–1104.
 51. Steiner D, Avidor-Reiss T, Schallmach E, Saya D, Vogel Z: Inhibition and superactivation of the calcium-stimulated isoforms of adenylyl cyclase: role of G $\beta\gamma$ dimers. *J Mol Neurosci*, 2005, 27, 195–203.
 52. Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM et al.: The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 1988, 22, 447–455.
 53. Watts VJ: Molecular mechanisms for heterologous sensitization of adenylyl cyclase. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 302, 1–7.
 54. Zhao H, Loh HH, Law PY: Adenylyl cyclase superactivation induced by long-term treatment with opioid agonist is dependent on receptor localized within lipid rafts and is independent of receptor internalization. *Mol Pharmacol*, 2006, 69, 1421–1432.
 55. Zuurbier CJ, Eerbeek O, Meijer AJ: Ischemic preconditioning, insulin, and morphine all cause hexokinase redistribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289, H496–499.

Received: August 4, 2011; **in the revised form:** November 7, 2011;
accepted: November 21, 2011.

10. 1. Příloha B

Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium

2011

Journal of Biomedical Science

18:89.

Drastichova, Z., **Skrabalova, J.**, Neckar, J., Kolar, F., Novotny, J.



The cost of publication in *Journal of Biomedical Science* is borne by the National Science Council, Taiwan



JOURNAL OF
BIOMEDICAL SCIENCE

RESEARCH

Open Access

Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium

Zdenka Drastichova¹, Jitka Skrabalova¹, Jan Neckar^{2,3}, Frantisek Kolar^{2,3} and Jiri Novotny^{1*}

Abstract

Background: Morphine is used in clinical practice as a highly effective painkiller as well as the drug of choice for treatment of certain heart diseases. However, there is lack of information about its effect on protein expression in the heart. Therefore, here we aimed to identify the presumed alterations in rat myocardial protein levels after prolonged morphine treatment.

Methods: Morphine was administered to adult male Wistar rats in high doses (10 mg/kg per day) for 10 days. Proteins from the plasma membrane- and mitochondria-enriched fractions or cytosolic proteins isolated from left ventricles were run on 2D gel electrophoresis, scanned and quantified with specific software to reveal differentially expressed proteins.

Results: Nine proteins were found to show markedly altered expression levels in samples from morphine-treated rats and these proteins were identified by mass spectrometric analysis. They belong to different cell pathways including signaling, cytoprotective, and structural elements.

Conclusions: The present identification of several important myocardial proteins altered by prolonged morphine treatment points to global effects of this drug on heart tissue. These findings represent an initial step toward a more complex view on the action of morphine on the heart.

Keywords: rat myocardium, morphine, proteomics

Background

Morphine, a highly effective analgesic used for treatment of different kinds of chronic pain states, may also exert significant cardiovascular effects [1-3]. Moreover, under certain conditions, this drug can be also implicated in the acquisition of cardioprotection against ischaemia-reperfusion injury [4-6]. However, the molecular mechanisms and consequences of morphine actions on the heart have not yet been fully elucidated. The majority of studies dealing with morphine in the field of cardiology are oriented on clinical usage of this drug and current cardiovascular research has been limited to the evaluation of factors or pathways believed to contribute to its physiological action, such as δ - and κ -opioid receptors, cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase or reactive oxygen species [7-10]. Because of great importance of this drug in clinical practice, and in

view of morphine unwanted effects on one side and cardioprotective potential on the other, investigation of its impact on the heart at the molecular level deserves more attention. A better understanding of the molecular mechanisms involved in morphine actions will require the evaluation of corresponding protein translation and the integration of these findings into the overall context.

Proteomic technology allows for the examination of global alterations in protein expression, and can provide new insights into the cellular mechanisms involved in cardiac dysfunction or other diseased states [11,12]. Apparently, this approach may also help to uncover the possible broader effects of variable exogenous or endogenous stimuli on the heart muscle. Proteomics is therefore very useful to investigate the changes in protein expression induced by various drugs or medicaments. To date, several reports have been published about the influence of morphine on protein expression in brain tissue [13-15], but there is lack of information regarding cardiac proteins under these conditions. Therefore, the

* Correspondence: novotnj99@natur.cuni.cz

¹Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University, Prague 2
Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Drastichova et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

main aim of this study was to assess the presumed effect of prolonged treatment of rats with high dose morphine on myocardial protein expression. Application of differential proteomic analysis enabled us to identify nine markedly altered proteins of different types in myocardial preparations from morphine-treated rats.

Methods

Materials

Acrylamide and bis-acrylamide were from SERVA (Heidelberg, Germany), SYPRO Ruby stain from Molecular Probes (Eugene, OR, USA) and nitrocellulose membrane from Schleicher-Schuell (Erdmannhausen, Germany). Immobiline DryStrips, Pharmalyte buffer, and secondary anti-rabbit antibody labeled with horseradish peroxidase were from GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA) and rabbit primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). All other chemicals were from Sigma (St. Louis, MI, USA) and they were of the highest purity available.

Animals and morphine treatment

Adult male Wistar rats were housed in groups of 3-4 in Plexiglas chambers with food and water available *ad libitum* and maintained on a 12-h light/dark cycle. All animal experiments were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The rats were injected intramuscularly with saline (CON group; $n = 10$) or morphine (10 mg/kg per day) (MOR group; $n = 10$) for 10 consecutive days. In some experiments, naloxone (10 mg/kg per day) or a combination of naloxone and morphine (both 10 mg/kg per day) were administered. Twenty four hours after the last dose, the animals were sacrificed by cervical dislocation and the hearts rapidly excised, dissected, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. In the withdrawal experiments, samples of cardiac tissue were procured from the animals sacrificed 3 days after the last dose of morphine.

Cardiac tissue fractionation

Frozen samples of left ventricles were placed into 10 volumes of ice-cold TMES buffer (20 mM Tris, 3 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA and 0.25 M sucrose; pH 7.4) containing the protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics), cut in small pieces and homogenized in an Ultra-Turrax blender (15 s). The resulting suspension was further homogenized for 1 min in a glass homogenizer with a motor-driven Teflon pestle, and then centrifuged at $600 \times g$ for 10 min at 4°C in order to remove large tissue debris and nuclear fragments. The resulting post-nuclear supernatant (PNS) was applied on the top of a

18% Percoll solution in TMES buffer and centrifuged at $60,000 \times g$ for 15 min. In this way, two layers containing opaque material were separated on the gradient. The translucent top portion (~ 3 ml) of the gradient containing soluble material was further centrifuged at $300,000 \times g$ to yield a clear supernatant cytosol fraction. The upper layer enriched in plasma membranes and the lower layer rich in mitochondria were separately diluted in TME buffer and centrifuged at $150,000 \times g$ for 1 h. The plasma membrane and mitochondrial pellet was then resuspended in TME buffer, snap-frozen in liquid nitrogen and stored in aliquots at -80°C until use.

Electrophoresis and immunoblotting

Protein samples solubilized in Laemmli buffer were resolved on standard 10% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membrane. After blocking with 3% nonfat dry milk, the membranes were probed with the appropriate antibodies and the immunodecorated protein bands visualized by enhanced chemiluminescence technique according to the manufacturer's instructions (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). The immunoblots were scanned and quantitatively analyzed by ImageQuantTM TL software (Amersham Biosciences).

Proteomic analysis

Samples of all three fractions were precipitated with 6% trichloroacetic acid for 1.5 h on ice and then solubilized in IEF buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 1% ampholines pH 3-10 and 0.01% bromophenol blue. Samples of 100 μg protein or 3 mg protein (for MALDI-TOF MS/MS analysis) were applied on immobilized pH 4-7 linear gradient strips. Proteins were separated using the Multiphor II apparatus (150 V, 5 h; 500 V, 1 h; 3500 V, 12.5 h). Strips were equilibrated for 15 min in 4 ml of EQ buffer (50 mM Tris, pH 6.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS) containing 1% DTT, followed by a second 15-min equilibration in EQ buffer containing 4% iodoacetamide and separated in the second dimension on 10% SDS-polyacrylamide gels using the Hoefer apparatus. Gels were stained with the fluorescent dye SYPRO Ruby or colloidal Coomassie G-250 for MALDI-TOF MS/MS and spot density was quantitatively analyzed by PDQuest software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as described previously [16]. Proteins with altered expression were identified using a 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer [16]. The obtained MS spectra were searched against the rat IPI database by Mascot v. 2.1 software (Matrix Science Ltd., London, UK). Criteria for positive identification of proteins with MS were set according to the scoring algorithm delineated in Mascot <http://www.matrixscience.com>. A minimum protein score of 60 ($p < 0.05$) were considered as statistical values for identification.

Miscellaneous

Protein concentration was determined by the BCA method [17]. Master reference gels for 2D proteome analysis were established by averaging the data of 12 replicas of each experimental group. Proteins isolated from spots in 2D gels showing significant quantitative differences (at least a 2-fold difference) between the groups were subjected to mass spectrometric analysis.

Results and discussion

Although a series of proteins in the heart have been shown to be qualitatively or quantitatively dysregulated under various pathophysiological conditions, there is no information about cardiac protein expression following morphine administration. Therefore, this study was designed to assess the presumed effect of prolonged morphine treatment of rats on protein profiling in cardiac tissue using a proteomics-based approach. The hearts obtained from control and morphine-treated (10 mg/kg per day) animals did not differ in weight and did not show any visual signs of gross pathology.

2D gel separation of myocardial proteins

Subcellular fractionation of tissue samples represents an important first step prior to 2D gel-based proteomics experiments, because it may reduce a high complexity of these samples and improve detection of low abundance proteins [18]. Therefore, left ventricles were homogenized and subfractionated into a plasma membrane-enriched fraction (PM), mitochondrial fraction (MT) and cytosol (CS). To examine the specificity of fractionation of heart tissue, immunoblot analysis was carried out against known subcellular markers. Na, K-ATPase (marker of PM), F₁-ATPase (marker of MT), and lactate dehydrogenase (marker of CS) were chosen because of their well established roles in the respective cellular fractions and immunoblots demonstrated the appropriate subcellular location for these proteins (Figure 1). Whereas there was no apparent cross-contamination of the CS fraction with membrane-bound proteins, the PM fraction was partially contaminated with MT proteins and vice versa. Nevertheless, this partial cross-contamination did not hamper subsequent proteomic analyses.

All three fractions (PM, MT and CS) were resolved in pH 4-7 IPG strips (IEF) and 10% polyacrylamide gels (SDS-PAGE). After SYPRO Ruby staining, about 500 protein spots were detected on each two-dimensional gel. The marked differences in 2D gel electrophoretic spot patterns observed between the CS, PM and MT fractions indicated that the procedure used for cardiac tissue fractionation was good enough to separate different cellular compartments (Figure 2A, B, and 2C). Our next comparative image analysis of 2D maps prepared

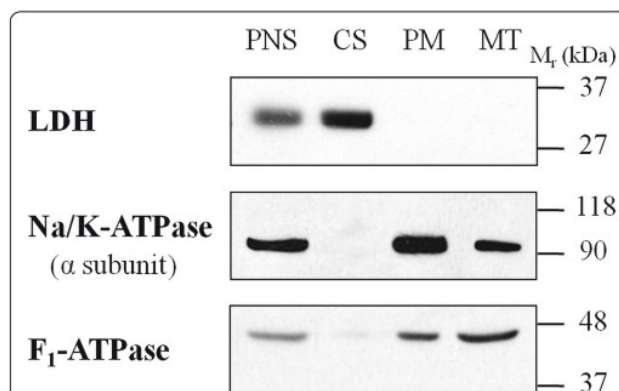


Figure 1 Distribution of marker proteins in fractionated samples of cardiac tissue. Protein samples (30 µg) of the postnuclear supernatant (PNS), cytosolic (CS), plasma membrane-enriched (PM) and mitochondrial (MT) fractions were subjected to immunoblotting with antibodies against lactate dehydrogenase (LDH), the α subunit of Na, K-ATPase, and F₁-ATPase.

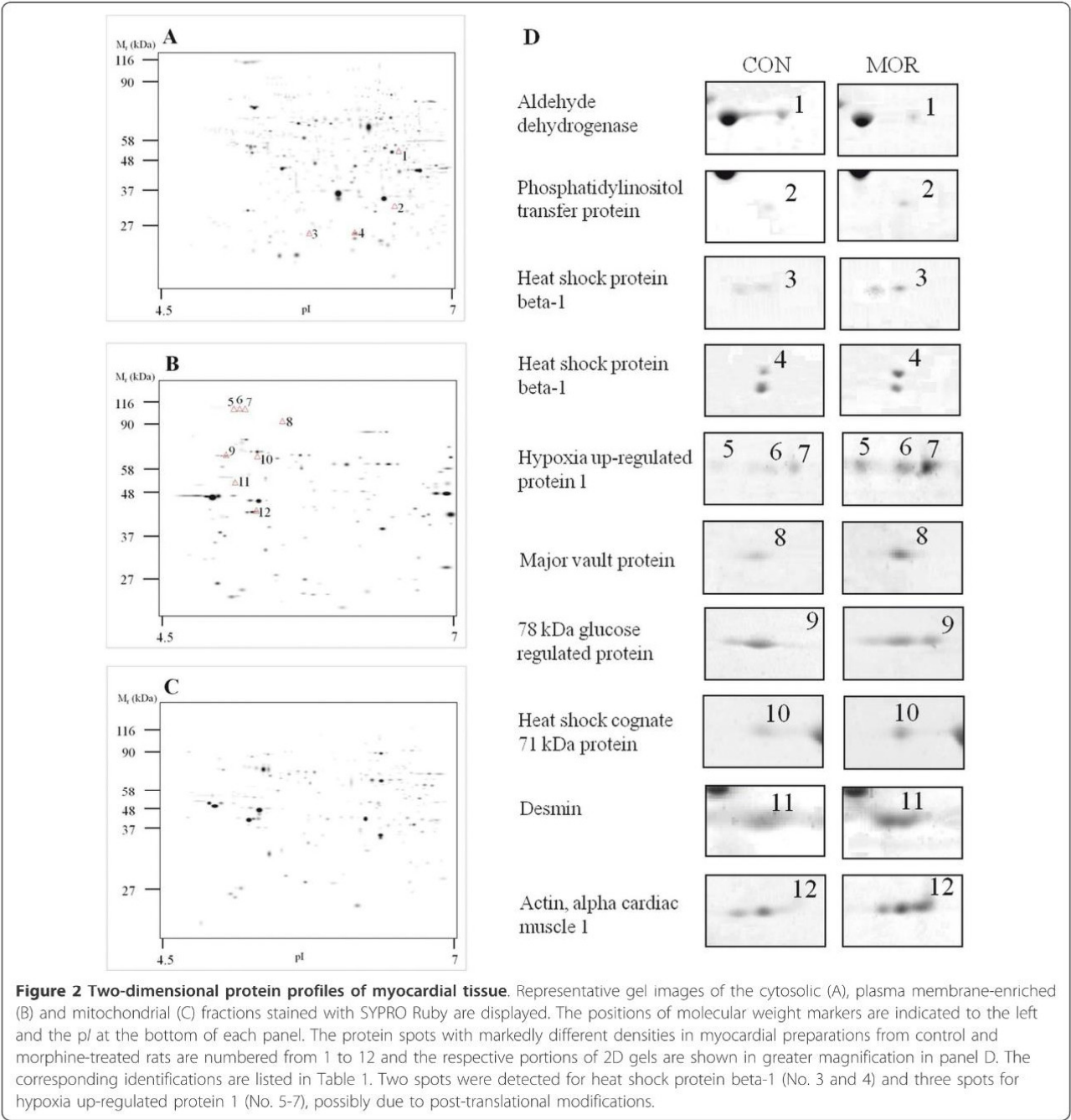
from cardiac fractions of morphine-treated and control rats revealed 12 differentially expressed protein spots (Figure 2D). Only spots which had over two-fold changes in density were classified as down- or up-regulated. The average difference in spot densities within control groups was about 20%. Two-fold changes in density can thus be considered sufficient to determine altered proteins. Whereas 4 of these significantly altered spots were found in the CS fractions, the other 8 were in the PM fractions. Interestingly, no significant changes were observed in 2D maps prepared from the MT fractions. All the altered proteins were subsequently identified by mass spectrometry.

Identification of differentially expressed proteins

Protein spots showing altered abundance levels were excised from the gel, in-gel digested with trypsin, and analyzed by MALDI-TOF MS/MS as described previously [16]. Peptide mass-fingerprinting and subsequent database searching revealed the identity of altered proteins as summarized in Table 1. As can be seen from the table, only one of all the identified proteins was down-regulated (mitochondrial precursor of aldehyde dehydrogenase) while all the others were up-regulated to different extent. Two of the altered proteins (heat shock protein beta-1 and hypoxia up-regulated protein 1) occurred with multiple forms differing in gel mobility. This likely reflects different post-translational modifications of these proteins, which have been previously described [19,20].

The role of differentially expressed proteins

Aldehyde dehydrogenases (ALDHs) are important enzymes that eliminate toxic aldehydes by catalyzing



their oxidation to non-reactive acids and they may have a role in combating oxidative stress by reducing the cellular ‘aldehydic load’ [21]. However, Wang et al. [22] recently reported that the level of ADH 2 is significantly down-regulated under oxidative stress conditions. Our present finding of decreased level of mitochondrial precursor of ADH in myocardial preparations from morphine-treated rats conforms well to the latter observation, because it is known that chronic exposure

to morphine can induce oxidative stress in various tissues [23,24].

Phosphatidylinositol transfer proteins (PITPs) are responsible for the transport of phosphatidylinositol and other phospholipids between membranes, and they participate in many cellular processes including signaling, lipid metabolism and membrane traffic [25]. It might be speculated that the increased level of the α isoform of PITP in morphine-exposed hearts can perhaps promote

Table 1 List of cardiac proteins with significantly altered expression after prolonged morphine treatment

Spot No.	Protein name	Protein ID	pI	MW (kDa)	Protscore	Expression (fold change)
1	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	ALDH2_RAT	6.63	56.5	74	↓ 3.3
2	Phosphatidylinositol transfer protein, alpha isoform	PIPNA_RAT	5.96	31.9	189	↑ 2.3
3	Heat shock protein beta-1	HSPB1_RAT	6.12	22.9	152	↑ 3.5
4	Heat shock protein beta-1	HSPB1_RAT	6.12	22.9	373	↑ 5.2
5	Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1_RAT	5.11	111.3	69	↑ 3.1
6	Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1_RAT	5.11	111.3	88	↑ 3.3
7	Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1_RAT	5.11	111.3	65	↑ 3.1
8	Major vault protein	MVP_RAT	5.42	95.8	66	↑ 5.3
9	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_RAT	5.07	72.3	95	↑ 3.2
10	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_RAT	5.37	70.9	59	↑ 2.3
11	Desmin	DESM_RAT	5.21	53.5	391	↑ 4.3
12	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_RAT	5.23	42.0	160	↑ 2.6

cardiomyocyte survival especially by affecting the aforementioned signaling processes. Phosphatidylinositol transfer activities of PITPs have been shown to be required for both PLC- and PI3K-mediated signaling [26,27], and the activity of these two signaling pathways is thought to play an important role in the development of a cardioprotective phenotype [28,29]. It might be worth mentioning in this context that morphine has been reported as an agent capable to induce cardioprotection under certain conditions [4-6].

Nevertheless, a major role in cytoprotection can be attributed to the set of heat shock proteins (HSPs), which function to limit protein aggregation, facilitate protein refolding and chaperone other proteins [30]. HSP27 (heat shock protein beta-1) and HSC70 (heat shock cognate 71 kDa protein) can be up-regulated under oxidative stress conditions [31,32], and, intriguingly, the levels of both these proteins were significantly elevated in cardiac preparations from morphine-treated rats. These data comply with the notion that morphine can cause oxidative stress. In line with this are also the observed increased levels of ORP150 (hypoxia up-regulated protein 1) and GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein), two chaperone molecules previously shown to be up-regulated by endoplasmic reticulum stress [20,33]. These two proteins serve important cytoprotective functions and can be up-regulated after numerous cellular insults. The increased expression of all the above cytoprotective proteins after prolonged morphine treatment was confirmed by immunoblot analysis (Figure 3). These results suggest that morphine administration can trigger stress response in cardiomyocytes and that the levels of intracellular heat shock and other stress-related proteins increase in order to provide cellular protection and maintain homeostasis under these conditions.

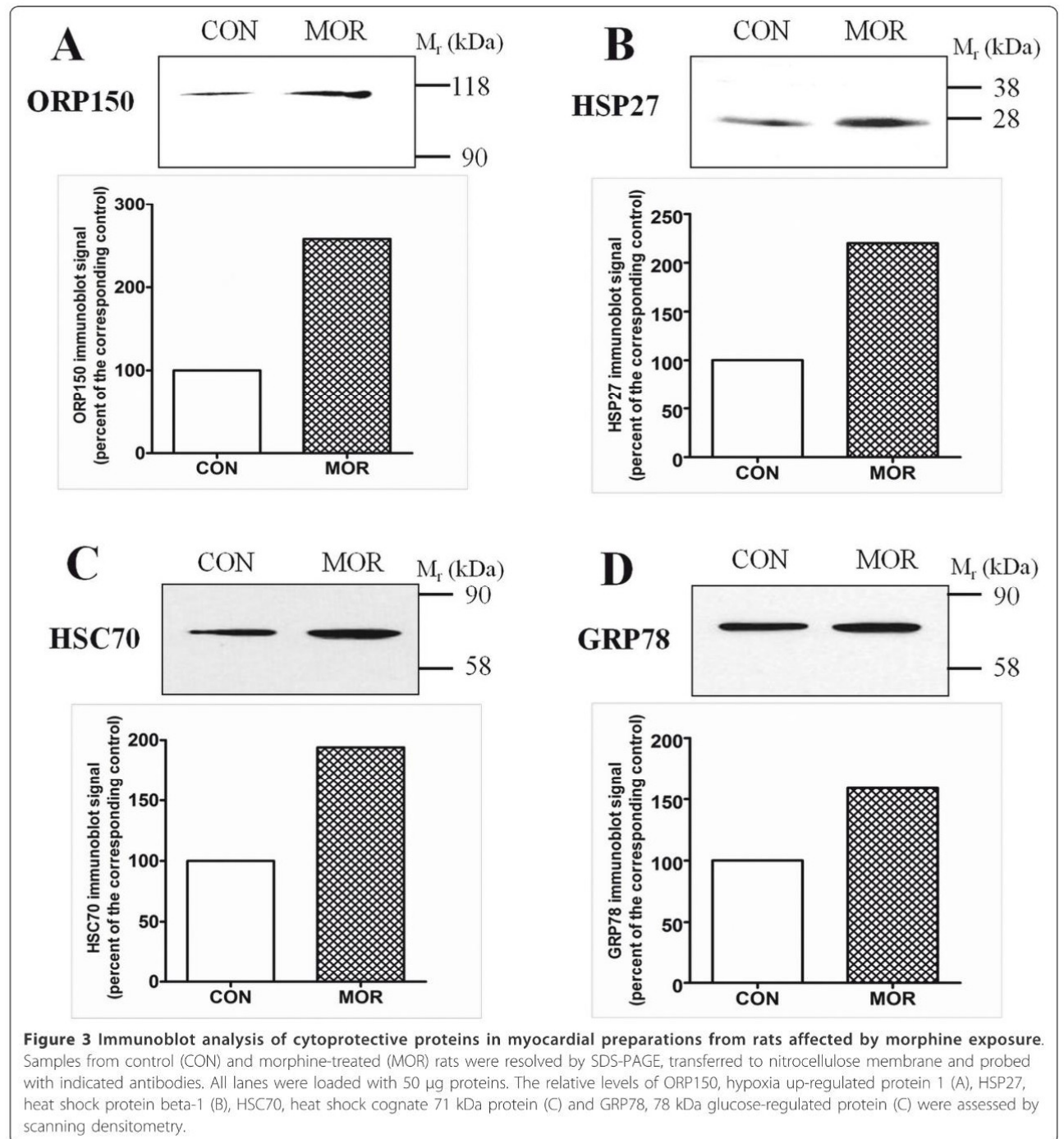
Changes found in the expression of two cytoskeletal/contractile proteins, desmin and cardiac muscle alpha

actin 1, may imply that prolonged morphine treatment could modulate formation of muscle fibres and muscle contraction. Previous data indicated that the cytoskeleton, together with contractile proteins, is a major site of the cellular damage and impairment of myocyte function in heart failure, and significant increase in these proteins, including desmin and alpha-cardiac actin, has been described in myocyte hypertrophy and failing hearts [34,35]. These proteins play important roles in cardiac integrity and contractility, but the consequences of their up-regulation are not quite clear.

The major vault protein (MVP) is supposed to be involved in different cellular processes, including intracellular signaling, cell survival, and differentiation and it can play a protective role against some xenobiotics and other stresses [36]. Our present finding of increased expression of this protein after morphine exposure may thus suggest that MVP could participate in mediating the presumed cardioprotective effects of this drug. Recently published data by Ikeda et al. [36] indicate that the PI3K/Akt pathway might be implicated in the cytoprotective effect of MVP. Interestingly, the protective function of PI3K signaling could be synergistically enhanced also by the observed increase of PITP expression.

Verification of the specificity of morphine effects

To determine whether the alterations observed in some cytoprotective proteins (ORP150, HSP27, HSC70 and GRP78) were induced by morphine or drug withdrawal, a set of experiments was performed using a group of animals, which were treated with morphine (10 mg/kg per day) for 10 days and then withdrawn for 3 days. As shown in Figure 4, the 3-day morphine withdrawal resulted in normalization of protein expression to control levels. These results indicate that the increase in the expression of cytoprotective proteins induced by morphine exposure can be reversed by the drug withdrawal.



To exclude the possibility that the observed protein changes could have been mediated by signaling pathways independent of opioid receptor activation, the opioid antagonist naloxone was employed in subsequent experiments [37]. Naloxone alone or a combination of naloxone and morphine was administered to rats and the levels of selected cytoprotective proteins in

myocardial preparations were assessed by immunoblotting (Figure 5). Naloxone did not alter expression of these proteins and the effect of morphine was completely blocked by this compound. These observations allow us to conclude that morphine exerted its effects through the activation of opioid receptors and its action was specific.

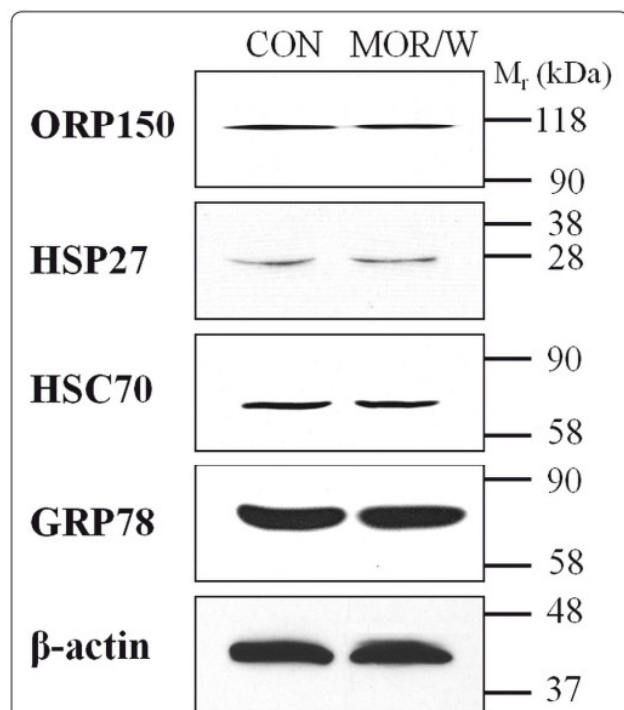


Figure 4 Effect of morphine withdrawal on the levels of cytoprotective proteins. Myocardial preparations (50 µg proteins) from control rats (CON) and morphine-treated (MOR/W) rats kept drug-free for 3 days after the last dose were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and probed with indicated antibodies. β-Actin was used as an internal standard.

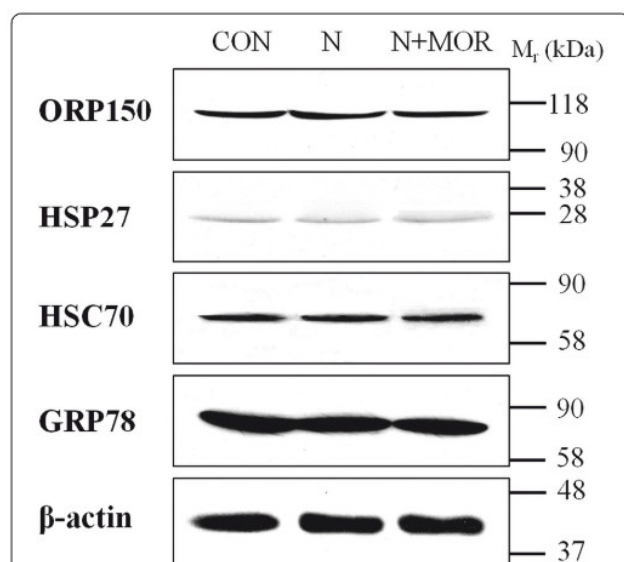


Figure 5 Effect of naloxone or a combination of naloxone and morphine on the levels of cytoprotective proteins. Myocardial preparations (50 µg proteins) from control (CON), naloxone-treated (N) or treated with both naloxone and morphine (N+MOR) rats were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and probed with indicated antibodies. β-Actin was used as an internal standard.

Concluding remarks

In this study, we adopted a proteomics-based approach to investigate the effect of morphine exposure on cardiac protein expression. Our results demonstrate that 10-day high dose morphine treatment altered the expression of several important proteins that are involved in anti-oxidative defence or cytoprotection, signaling, and cytoskeletal/contractile structures. These data indicate for the first time that morphine can induce a wide range of effects in the heart and future studies will involve exploring the function and regulation of these proteins in more detail.

Acknowledgements

We greatly appreciate the professional assistance of Petr Jedelsky with mass spectrometric analysis. This work was supported by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (IAA501110901), the Charles University Grant Agency (6409 and 429511), and the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic (MSM0021620858).

Author details

¹Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University, Prague 2. ²Department of Developmental Cardiology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic. ³Centre for Cardiovascular Research, Prague 4, Czech Republic.

Authors' contributions

ZD and JS performed the major experiments and analyzed the data. JNe made substantial contribution to conception and design of the study and participated in experiments with animals and in data interpretation. FK participated in data interpretation and manuscript improvement. JNo conceived the study, designed the experiments, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 9 September 2011 Accepted: 30 November 2011

Published: 30 November 2011

References

1. Paterna S, Di Pasquale P, Montaina G, Procaccianti P, Antona A, Scaglione R, Parrinello G, Martino S, Licata G: **Effect of heroin and morphine on cardiac performance in isolated and perfused rabbit heart: evaluation of cardiac haemodynamics, myocardial enzyme activity and ultrastructure features.** *Cardiologia* 1991, **36**(10):811-815.
2. Rabadan JV, Milanes MV, Laorden ML: **Effects of chronic morphine treatment on catecholamines content and mechanical response in the rat hearts.** *J Pharmacol Exp Ther* 1997, **280**(1):32-37.
3. Lun'kova LK, Makarova OV, Kakturskii LV, Chernikov VP, Sudakov SK, Mkhitarov VA: **[Morphological alterations of the rat myocardium in chronic morphine intoxication].** *Arkh Patol* 2004, **66**(5):17-21.
4. Murphy GS, Szokol JW, Marymont JH, Avram MJ, Vender JS: **Opioids and cardioprotection: the impact of morphine and fentanyl on recovery of ventricular function after cardiopulmonary bypass.** *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2006, **20**(4):493-502.
5. Li R, Wong GT, Wong TM, Zhang Y, Xia Z, Irwin MG: **Intrathecal morphine preconditioning induces cardioprotection via activation of delta, kappa, and mu opioid receptors in rats.** *Anesth Analg* 2009, **108**(1):23-29.
6. Peart JN, Hoe LE, Gross GJ, Headrick JP: **Sustained ligand-activated preconditioning via delta-opioid receptors.** *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **316**(1):274-281.
7. Huh J, Gross GJ, Nagase H, Liang BT: **Protection of cardiac myocytes via delta(1)-opioid receptors, protein kinase C, and mitochondrial K(ATP) channels.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, **280**(1):H377-383.

8. Wang GY, Wu S, Pei JM, Yu XC, Wong TM: Kappa- but not delta-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, **280**(1): H384-391.
9. Jiang X, Shi E, Nakajima Y, Sato S: COX-2 mediates morphine-induced delayed cardioprotection via an iNOS-dependent mechanism. *Life Sci* 2006, **78**(22):2543-2549.
10. Xu J, Tian W, Ma X, Guo J, Shi Q, Jin Y, Xi J, Xu Z: The Molecular Mechanism Underlying Morphine-Induced Akt Activation: Roles of Protein Phosphatases and Reactive Oxygen Species. *Cell Biochem Biophys* 2011.
11. Ping P, Chan DW, Srinivas P: Advancing cardiovascular biology and medicine via proteomics: Opportunities and present challenges of cardiovascular proteomics. *Circulation* 2010, **121**(21):2326-2328.
12. Cruz-Topete D, List EO, Okada S, Kelder B, Kopchick JJ: Proteomic changes in the heart of diet-induced pre-diabetic mice. *J Proteomics* 2011, **74**(5):716-727.
13. Bierzynska-Krzysik A, Pradeep John JP, Silberring J, Kotlinska J, Dylag T, Cabatic M, Lubec G: Proteomic analysis of rat cerebral cortex, hippocampus and striatum after exposure to morphine. *Int J Mol Med* 2006, **18**(4):775-784.
14. Yang L, Sun ZS, Zhu YP: Proteomic analysis of rat prefrontal cortex in three phases of morphine-induced conditioned place preference. *J Proteome Res* 2007, **6**(6):2239-2247.
15. Bodzon-Kulakowska A, Kulakowski K, Drabik A, Moszczynski A, Silberring J, Suder P: Morphine-a meta-analysis applied to proteomics studies in morphine dependence. *Proteomics* 2011, **11**(1):5-21.
16. Drastichova Z, Bourova L, Hejnova L, Jedelsky P, Svoboda P, Novotny J: Protein alterations induced by long-term agonist treatment of HEK293 cells expressing thyrotropin-releasing hormone receptor and G11alpha protein. *J Cell Biochem* 2010, **109**(1):255-264.
17. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985, **150**(1):76-85.
18. Lee YH, Tan HT, Chung MC: Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics. *Proteomics* 2010, **10**(22):3935-3956.
19. Ferns G, Shams S, Shafi S: Heat shock protein 27: its potential role in vascular disease. *Int J Exp Pathol* 2006, **87**(4):253-274.
20. Ikeda J, Kaneda S, Kuwabara K, Ogawa S, Kobayashi T, Matsumoto M, Yura T, Yanagi H: Cloning and expression of cDNA encoding the human 150 kDa oxygen-regulated protein, ORP150. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **230**(1):94-99.
21. Chen CH, Sun L, Mochly-Rosen D: Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovasc Res* 2010, **88**(1):51-57.
22. Wang J, Wang H, Hao P, Xue L, Wei S, Zhang Y, Chen Y: Inhibition of aldehyde dehydrogenase 2 by oxidative stress is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. *Mol Med* 2011, **17**(3-4):172-179.
23. Payabvash S, Beheshtian A, Salmasi AH, Kiumehr S, Ghahremani MH, Tavangar SM, Sabzevari O, Dehpour AR: Chronic morphine treatment induces oxidant and apoptotic damage in the mice liver. *Life Sci* 2006, **79**(10):972-980.
24. Turchan-Cholewo J, Dimayuga FO, Gupta S, Keller JN, Knapp PE, Hauser KF, Bruce-Keller AJ: Morphine and HIV-Tat increase microglial-free radical production and oxidative stress: possible role in cytokine regulation. *J Neurochem* 2009, **108**(1):202-215.
25. Cockcroft S, Garner K: Function of the phosphatidylinositol transfer protein gene family: is phosphatidylinositol transfer the mechanism of action? *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2011, **46**(2):89-117.
26. Thomas GM, Cunningham E, Fensome A, Ball A, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Cockcroft S: An essential role for phosphatidylinositol transfer protein in phospholipase C-mediated inositol lipid signaling. *Cell* 1993, **74**(5):919-928.
27. Cosker KE, Shadan S, van Diepen M, Morgan C, Li M, Allen-Baume V, Hobbs C, Doherty P, Cockcroft S, Fickholt BJ: Regulation of PI3K signalling by the phosphatidylinositol transfer protein PITPalpha during axonal extension in hippocampal neurons. *J Cell Sci* 2008, **121**(Pt 6):796-803.
28. Tappia PS, Asemu G, Rodriguez-Leyva D: Phospholipase C as a potential target for cardioprotection during oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol* 2010, **88**(3):249-263.
29. Hu X, Xu C, Zhou X, Cui B, Lu Z, Jiang H: PI3K/Akt signaling pathway involved in cardioprotection of preconditioning with high mobility group box 1 protein during myocardial ischemia and reperfusion. *Int J Cardiol* 2011, **150**(2):222-223.
30. Kim HP, Morse D, Choi AM: Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets* 2006, **10**(5):759-769.
31. Abruzzo PM, di Tullio S, Marchionni C, Belia S, Fano G, Zampieri S, Carraro U, Kern H, Sgarbi G, Lenaz G, Marini M: Oxidative stress in the denervated muscle. *Free Radic Res* 2010, **44**(5):563-576.
32. Bernardini C, Fantinati P, Zannoni A, Forni M, Tamanini C, Bacci ML: Expression of HSP70/HSC70 in swine blastocysts: effects of oxidative and thermal stress. *Mol Reprod Dev* 2004, **69**(3):303-307.
33. Dukes AA, Van Laar VS, Cascio M, Hastings TG: Changes in endoplasmic reticulum stress proteins and aldolase A in cells exposed to dopamine. *J Neurochem* 2008, **106**(1):333-346.
34. Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J: The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev* 2000, **5**(3):271-280.
35. Berni R, Savi M, Bocchi L, Delucchi F, Musso E, Chaponnier C, Gabbiani G, Clement S, Stili D: Modulation of actin isoform expression before the transition from experimental compensated pressure-overload cardiac hypertrophy to decompensation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009, **296**(5):H1625-1632.
36. Ikeda R, Iwashita K, Sumizawa T, Beppu S, Tabata S, Tajitsu Y, Shimamoto Y, Yoshida K, Furukawa T, Che XF, Yamaguchi T, Ushiyama M, Miyawaki A, Takeda Y, Yamamoto M, Zhao HY, Shibayama Y, Yamada K, Akiyama S: Hyperosmotic stress up-regulates the expression of major vault protein in SW620 human colon cancer cells. *Exp Cell Res* 2008, **314**(16):3017-3026.
37. Chen SL, Ma H, Han JM, Lu RB, Tao PL, Law PY, Loh HH: Antinociceptive effects of morphine and naloxone in mu-opioid receptor knockout mice transfected with the MOR5196A gene. *J Biomed Sci* 2010, **17**:28.

doi:10.1186/1423-0127-18-89

Cite this article as: Drastichova et al.: Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium. *Journal of Biomedical Science* 2011 **18**:89.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



10. 3. Příloha C

Global changes in the rat heart proteome induced by prolonged morphine treatment and withdrawal

2012

PLoS One

7(10): e47167

Drastichova, Z., **Skrabalova, J.**, Jedelsky, P., Neckar, J., Kolar, F., Novotny, J.

Global Changes in the Rat Heart Proteome Induced by Prolonged Morphine Treatment and Withdrawal

Zdenka Drastichova¹, Jitka Skrabalova¹, Petr Jedelsky², Jan Neckar³, Frantisek Kolar³, Jiri Novotny^{1*}

1 Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, **2** Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, **3** Department of Developmental Cardiology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Abstract

Morphine belongs among the most commonly used opioids in medical practice due to its strong analgesic effects. However, sustained administration of morphine leads to the development of tolerance and dependence and may cause long-lasting alterations in nervous tissue. Although proteomic approaches enabled to reveal changes in multiple gene expression in the brain as a consequence of morphine treatment, there is lack of information about the effect of this drug on heart tissue. Here we studied the effect of 10-day morphine exposure and subsequent drug withdrawal (3 or 6 days) on the rat heart proteome. Using the iTRAQ technique, we identified 541 proteins in the cytosol, 595 proteins in the plasma membrane-enriched fraction and 538 proteins in the mitochondria-enriched fraction derived from the left ventricles. Altogether, the expression levels of 237 proteins were altered by morphine treatment or withdrawal. The majority of changes (58 proteins) occurred in the cytosol after a 3-day abstinence period. Significant alterations were found in the expression of heat shock proteins (HSP27, α -B crystallin, HSP70, HSP10 and HSP60), whose levels were markedly up-regulated after morphine treatment or withdrawal. Besides that morphine exposure up-regulated MAPK p38 (isoform CRA_b) which is a well-known up-stream mediator of phosphorylation and activation of HSP27 and α -B crystallin. Whereas there were no alterations in the levels of proteins involved in oxidative stress, several changes were determined in the levels of pro- and anti-apoptotic proteins. These data provide a complex view on quantitative changes in the cardiac proteome induced by morphine treatment or withdrawal and demonstrate great sensitivity of this organ to morphine.

Citation: Drastichova Z, Skrabalova J, Jedelsky P, Neckar J, Kolar F, et al. (2012) Global Changes in the Rat Heart Proteome Induced by Prolonged Morphine Treatment and Withdrawal. PLoS ONE 7(10): e47167. doi:10.1371/journal.pone.0047167

Editor: Xin-Liang Ma, Thomas Jefferson University, United States of America

Received: August 6, 2012; **Accepted:** September 10, 2012; **Published:** October 9, 2012

Copyright: © 2012 Drastichova et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (IAA501110901), the Charles University Grant Agency (429511), the Czech Ministry of Education, Youth and Sport (MSM0021620858) and by the grant SVV-2012-265206. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: novotnj99@natur.cuni.cz

Introduction

Morphine is one of the most effective drugs known for pain-relieving effects and it has been successfully used in medical practice for a long time as a powerful analgesic to treat many kinds of chronic pain [1–3]. Morphine exerts its physiological effects through opioid receptors (ORs), which belong to the large family of G protein-coupled receptors (GPCRs) [4]. Because ORs are mainly expressed in the central nervous system [5–6], and morphine is a potentially highly addictive substance [7–9], a great deal of attention has been paid to studying the impact of morphine and other opioids on nervous tissue.

Chronic administration of morphine was found to induce changes in OR-mediated signaling, which may underlie the development of opioid tolerance and dependence [10–11]. Importantly, neuronal changes induced by opioids have been observed to persist for a long time following cessation of drug exposure [12]. A number of studies indicated that morphine affects the expression of genes involved in processes as diverse as cell signaling [13–16], transcription [17–18], apoptosis [19–20] and cytoskeleton assembly [21]. Nowadays, there is increasing evidence to show that morphine can alter protein expression in different brain areas, even following a single dose. Numerous

proteomic studies further expanded the list of brain proteins potentially altered by morphine [22–31]. Protein changes induced by morphine treatment have also been observed in *in vitro* experiments on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line, CHO (Chinese hamster ovary) epithelial cells [32–33] and primary cortical astrocytes [34].

Whereas the pharmacology and function of opioids in the central nervous system have been quite extensively characterized, the actions of these drugs in peripheral tissues are relatively less understood. It has been well established that morphine may exert significant effects on cardiovascular system [35] and it is used for treatment of some types of heart disease [36]. Morphine has also been studied in connection with its potential cardioprotective effects against ischemia-reperfusion injury [37–40]. Despite its broad therapeutic application, the current knowledge regarding morphine effects on myocardial protein expression is rather limited. In our previous study, we found that prolonged administration of high doses of morphine to rats up-regulated the expression of some cytoprotective proteins in the left ventricular myocardium, such as ORP150 (hypoxia up-regulated protein1), GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein), HSP27 (heat shock protein beta-1) and HSC71 (heat shock cognate 71 kDa protein) [41]. However, information about the possible

effect of morphine withdrawal on the expression of myocardial proteins is missing.

Our present work dealing with the impact of prolonged morphine treatment and subsequent withdrawal on the rat heart proteome has been designed to allow extension of previous findings which were based on a rather limited number of protein spots showing alterations in intensity on 2D gels. For this purpose we used a novel proteomic method called iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation). Besides two-dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) or proteomic methods based on stable isotope labeling (e.g., isotope-coded affinity tag (ICAT) and stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC)), the iTRAQ technique has proved to be very suitable especially for comparative studies in which more than two samples should be evaluated in parallel [42–43]. This approach was demonstrated to be more sensitive than 2D-DIGE and ICAT [44]. In contrast to the methods using stable isotope labeling, iTRAQ enables all samples to be processed simultaneously, which reduces analysis time [45]. The big advantage of iTRAQ over 2D electrophoresis, which is the most commonly used method in proteomics, lies in the possibility of identifying low abundant proteins [46] as well as integral membrane proteins [47]. Membrane proteins must be solubilized by detergents before 2D electrophoresis, which can be quite a difficult task [48–49]. iTRAQ is a powerful proteomic approach based on usage of four amine specific isobaric reagents which label the primary amines of peptides from four different biological samples. These isobaric mass labels are placed at the N-termini and lysine side chains of peptides and produce abundant MS/MS signature ions at m/z 114.1, 115.1, 116.1, and 117.1. Their relative peak areas are determined by the relative proportions of the labeled peptides [43]. Using this proteomic technique we succeeded in identifying 1090 proteins and revealed that both prolonged morphine treatment and withdrawal is accompanied with wide-ranging changes in myocardial proteins involved in different functions.

Methods

Animal Model

All animal experiments complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) and they were performed with the approval of the Animal Care and Use Committee of the Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic (Protocol #52/2008). Adult male Wistar rats were housed in groups of 3–4 in standard boxes enriched with saw-dust bedding. They were maintained on a 12-h light/dark cycle with ad libitum access to food and water. Control group of rats (C, $n = 10$) received an intramuscular (i.m.) injection of sterile normal saline and three groups of animals ($n = 10$ each) were treated with morphine (10 mg/kg/day, i.m. injection for 10 consecutive days). The first group of morphine-exposed animals was sacrificed 24 h (M), the second group 3 days (M_{W-I}) and the third group 6 days (M_{W-II}) after the last dose to assess the presumed impact of drug withdrawal. After terminating the experiments, hearts were rapidly excised, dissected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Cardiac Tissue Processing

Samples of cardiac tissue were processed basically the same way as described previously [41]. Briefly, the left ventricles were cut into small pieces by scissors and then homogenized on ice using an Ultra-Turrax homogenizer. After subsequent homogenization in a glass-Teflon homogenizer, the suspension was centrifuged at low speed for a short time and the resulting postnuclear supernatant

(PNS) collected. The pellet was re-homogenized and the second part of the PNS collected after low-speed centrifugation was mixed with the PNS obtained in the preceding step. The final PNS was fractionated on a Percoll density gradient into three major fractions: cytosol (CS) and plasma membrane (PM)- and mitochondria (MT)-enriched fractions. The whole fractionation procedure is described in detail on a schematic flow diagram (Fig. 1). The final aliquots of cytosol, PM- and MT-enriched fractions were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Proteomic Analysis

For the iTRAQ analysis acetone precipitated protein samples (100 μg each) were dissolved in buffer provided in iTRAQ 4-plex reagent kit (AB Sciex, Foster City, CA) and treated as described by manufacturer. Labeled samples were pooled and precipitated with acetone. Pellet was dissolved in 2 M urea in LC-MS grade water prior to isoelectric focusing on 17 cm immobilized pH gradient strips pH 3–10 (Bio-Rad, Hercules, CA) for 40,000 Vhrs. The strip was cut into slices 2 mm wide, which were separately extracted with 50% acetonitrile and 1% trifluoroacetic acid. Supernatant was diluted 1:1 by water and used for LC-MALDI.

LC-MALDI analyses were performed on Ultimate 3000 HPLC system (Dionex, Framingham, MA) coupled to Probot micro-fraction collector (Dionex). Tryptic peptides were loaded onto a PepMap 100 C18 RP column (3 μm particle size, 15 cm long, 75 μm internal diameter; Dionex) and separated by a gradient of 5% (v/v) acetonitrile, 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid to 80% (v/v) acetonitrile, 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid over a period of 60 min. The flow rate was set to 300 nL/min. Eluate was mixed in proportion of 1:3 with matrix solution (2 mg/mL α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 80% ACN) prior to spotting onto a MALDI target. Spectra were acquired on 4800 Plus MALDI TOF/TOF analyzer (Applied Biosystems/MDS Sciex) equipped with a Nd:YAG laser (355 nm, firing rate 200 Hz). All spots were first measured in MS mode and then up to 12 strongest precursors were selected for MS/MS analysis which was performed with collision energy of 1 kV and operating pressure of collision cell set to 10^{-6} Torr. Tandem mass spectra were processed with 4000 Series Explorer with subtract baseline enabled (peak width 50), Gaussian smoothing enabled (filter width 5), minimum signal to noise 8, local noise window width 250 m/z , minimum peak width at full width half max 2.9 bins, cluster area signal to noise optimization enabled (threshold 15), flag monoisotopic peaks enabled.

Protein identification and quantitation were performed using Protein Pilot 4.0 (AB Sciex). MS/MS spectra were searched against Rattus norvegicus sequences assembly downloaded from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) with the following settings: Trypsin digestion (semitypic peptides allowed), methyl methanethiosulfonate modification of cysteines, iTRAQ 4-plex labeled peptides, instrument 4800, no special factors, default iTRAQ isotope correction settings, quantification, bias correction, background correction, biological modifications and thorough ID parameters selected. Probabilities of modifications were not altered. Detected protein threshold (unused protein score and confidence of results) was set to 2.0 and 99.0% and false discovery rate analysis was enabled. Proteins sharing a set of peptides were grouped automatically with default Pro Group™ Algorithm. Ratios of iTRAQ were calculated with default settings of the Protein Pilot. Protein fold change (iTRAQ ratio for individual protein) was calculated automatically by the Protein Pilot software as a weighted average of Log iTRAQ ratios determined for individual peptides belonging to the particular protein after

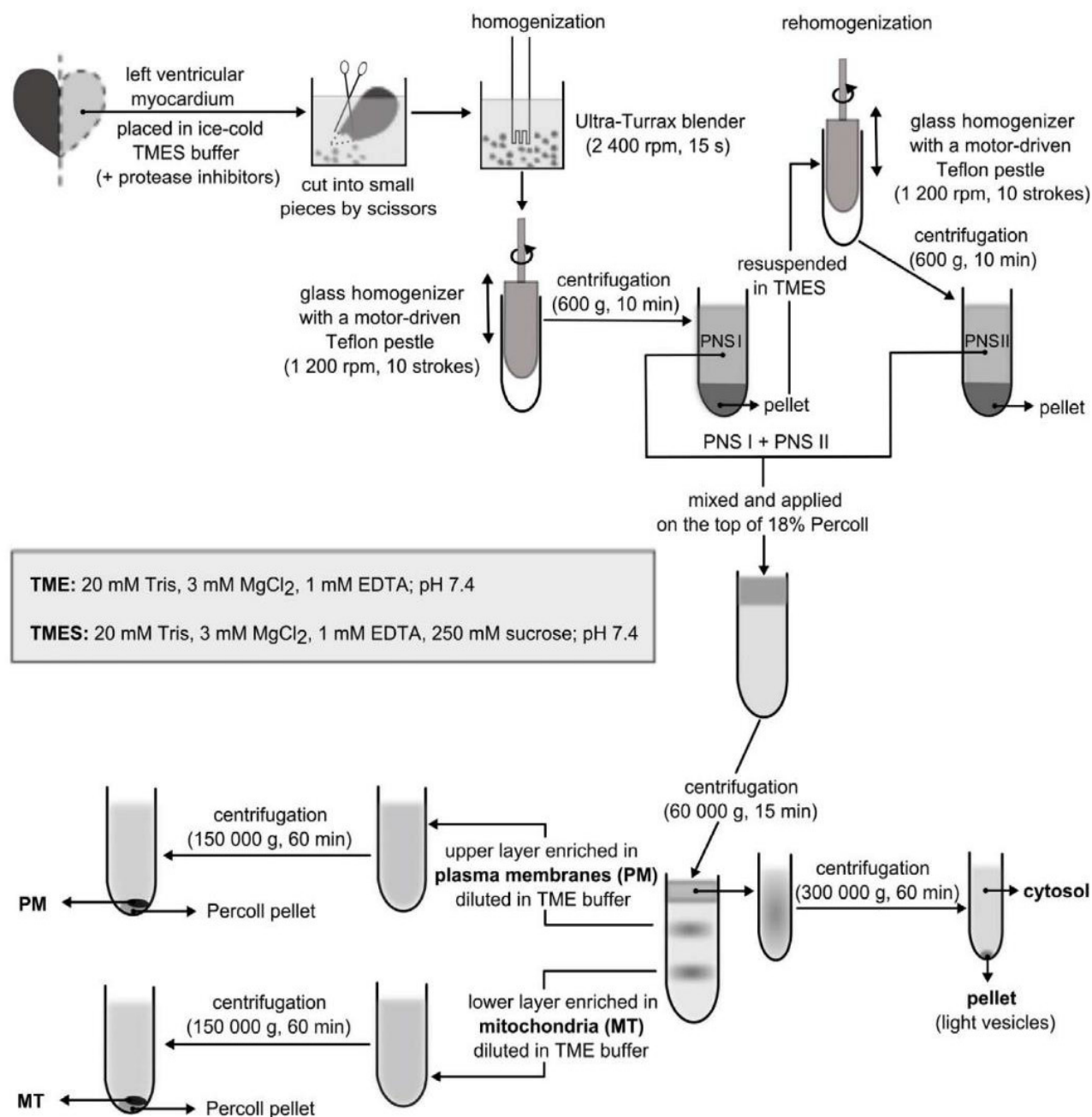


Figure 1. Flow diagram of the fractionation procedure for the rat myocardium. The left ventricles were cut into small pieces with dissecting scissors, homogenized using an Ultra-Turrax homogenizer and subsequently with a motorized glass-Teflon homogenizer. The postnuclear supernatant (PNS I) after low-speed centrifugation was collected and the pellet rehomogenized in a glass-Teflon homogenizer. The resulting postnuclear supernatant (PNS II) was collected, mixed with PNS I and applied on the top of 18% Percoll density gradient. After high-speed centrifugation, the top portion of the gradient mainly containing soluble material was further centrifuged to yield a clear cytosolic fraction. The upper layer enriched in plasma membranes (PM) and the lower layer rich in mitochondria (MT) were separately diluted in TME buffer and spun down to remove the Percoll, which formed a compact glassy pellet at the bottom of the centrifuge tube. The sedimented PM or MT containing material formed a loose white layer on the Percoll pellet and could be easily collected by pipetting. All centrifugation steps were performed at 4°C and tubes were kept on ice during samples collection.
doi:10.1371/journal.pone.0047167.g001

background subtraction. To estimate the false discovery rate (FDR) a decoy database search was performed. For each protein ratio the Protein Pilot reported p-value and EF (error factor). To be considered as differentially expressed, individual proteins had to fulfill the following statistical criteria: P value < 0.05, EF < 1.5 and average iTRAQ ratio > 2.

Electrophoresis and Western Blotting

Different preparations of myocardial fractions were solubilized in Laemmli sample buffer and proteins separated by standard SDS-PAGE. After electrotransfer onto nitrocellulose membranes, selected proteins were detected on Western blots using appropriate antibodies. Immunochemically reactive proteins were visualized

by conventional enhanced chemiluminescence detection (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). The Western blots were scanned and evaluated quantitatively by means of densitometry using ImageQuantTM TL software (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK).

Results and Discussion

Identification of Proteins in Myocardial Fractions

The left ventricles isolated from control (C), morphine-treated (M) and morphine-withdrawn (M_{W-I} and M_{W-II}) rats were subfractionated into cytosolic (CS), plasma membrane (PM)- and mitochondria (MT)-enriched fractions (Fig. 1). Enrichment of these fractions with typical cytosolic, plasma membrane-bound or mitochondrial proteins was demonstrated previously [41]. Proteins present in each preparation were digested with trypsin and peptide populations in the individual fractions were labeled with distinct iTRAQ reagents. The corresponding peptide populations from samples of all four experimental groups were then combined for further analyses.

Using this approach, 541 proteins were identified in the cytosol, 595 proteins in the PM-enriched fraction and 538 proteins in the MT-enriched fraction. Some of these proteins were found in two or all three fractions simultaneously. Altogether, 1090 different proteins were identified in all three fractions prepared from rat heart. The proteins detected in each fraction were divided according to their localization or function and their distributions depicted in the form of pie charts (Fig. 2).

Almost three-quarters of all proteins determined in the cytosol were specific only for this fraction and were not present in the other two fractions or at least they did not occur there in detectable amounts. On the other hand, around half of the proteins found in the PM-enriched fraction were present also in the MT-enriched fraction, and *vice versa*. However, relatively extensive cross-contamination of these two fractions did not preclude the assessment of many typical plasma membrane or mitochondrial proteins in these preparations. Although the proteins found in both PM- and MT-enriched fractions most often belonged to the mitochondrial compartment, the PM-enriched fraction harbored a far greater number of PM-bound proteins than MT-enriched fraction and it was enriched in such PM proteins as caveolin 1, caveolin 2 and caveolin 3, flotillin 1, G β_2 subunit, AP-2 α_1 subunit and AP-2 σ_1 subunit. Whereas four different subunits of spectrin (erythrocytic spectrin α_1 , erythroid spectrin β , spectrin β_2 , α -fodrin (spectrin α_2)), which represents an important scaffold protein crosslinking the PM with actin skeleton, were detected only in the PM-enriched fraction, non-erythrocytic spectrin β_1 was found only in the MT-enriched fraction. Some of the PM-bound proteins (Na,K-ATPase α_1 subunit precursor, Na,K-ATPase α_2 subunit precursor, G α_{i2} subunit) were detected in both membrane fractions and others (clathrin heavy chain) in the PM-enriched fraction and cytosol.

Protein classification according to their functional categories revealed that the largest group in each of the three fractions comprised the proteins participating in metabolic processes (Fig. 2). This finding is in agreement with some previous reports indicating a high proportion of metabolic proteins in the rat cardiac proteome [50–51]. Interestingly, both membrane fractions (PM and MT) contained approximately twice more transport proteins than the cytosolic fraction.

Proteins were considered as up- or down-regulated only if at least two-fold change was recorded in the protein abundance. Levels of 237 proteins were found to be altered in myocardial samples from morphine-exposed or withdrawn rats as compared

with the corresponding controls. In order to describe synoptically which cell functions might have been affected by morphine treatment or withdrawal, distribution of altered proteins according to their function has been depicted using Venn diagrams for each group (M, M_{W-I} and M_{W-II}) and fraction (CS, PM and MT) (Fig. 3, 4 and 5).

The proteins whose levels were altered by morphine treatment or withdrawal are listed in Table S1 (see Supplement). Whereas administration of morphine for 10 days changed the expression of 72 myocardial proteins, subsequent 3- or 6-day drug abstinence was accompanied by alteration in 105 or 60 proteins, respectively. Proteins with significantly altered expression levels were unevenly distributed between all three myocardial fractions: 121 proteins were found in the cytosol, 30 proteins in the PM-enriched fraction, 69 proteins in the MT-enriched fraction and 17 altered proteins occurred in two or three fractions simultaneously. The majority of proteins with altered expression were found in the cytosolic compartment and most changes (58) appeared 3 days after morphine withdrawal. Hence, drug withdrawal was apparently associated with more profound alterations in the rat cardiac proteome than sustained morphine treatment alone. Most of the altered proteins included those involved in the metabolism, structural support and regulation of protein expression. All the identified proteins whose levels were not significantly altered are listed in Table S2 (see Supplement).

Proteins Involved in Signal Transduction

All detected proteins can be arranged into several groups according to their function or structural homology. Some proteins such as ribosomal proteins or small G proteins (members of Rab family, RhoA, Rac2, RAP1A, Ran or Ral-A) were not altered at all. However, it does not mean that the fate of small G proteins cannot be influenced by morphine treatment or withdrawal. Interestingly, the level of GDP dissociation inhibitor 2 (GDI-2) which regulates the translocation of GDP-bound Rabs from and to the membrane [52] decreased 2.3 times following a 3-day morphine abstinence period. It can be speculated that membrane release and activation of Rab proteins might have been affected under these conditions [53].

As mentioned above, mass spectrometry analysis allowed the identification of some subunits of trimeric G proteins and also some other proteins, which can be involved in signal transduction mediated by opioid receptors. We did not reveal any alterations in the amount of G α_{i2} protein, G β_2 protein, GNAS complex locus Xlas (fragment of the long isoform of G α_s protein) or subunits of c-AMP dependent protein kinases (PKA catalytic subunit α , PKA I regulatory subunit α , PKA II regulatory subunit α). Interestingly, 6-day morphine withdrawal resulted in up-regulation of caveolin 1 (2.0-fold) and flotillin 1 (2.1-fold), which could imply a possible reorganization of the plasma membrane and increased formation of caveolae and lipid rafts [54].

Although there was no detectable amount of protein kinase C isoforms, some proteins with protein kinase activity or proteins engaged in PKC signaling, such as PKC substrates or binding proteins (PKC and casein kinase substrate in neurons protein 2, PKC and casein kinase substrate in neurons protein 3, PKC δ -binding protein, PKC substrate 80K-H), were identified mainly in the PM-enriched fraction. However, the myocardial expression of these proteins was not affected by morphine treatment. Similarly, no changes were found in the levels of the identified protein phosphatases (PP1 catalytic subunit α , PP1 catalytic subunit β , PP2A catalytic subunit β , PP2A regulatory subunit A α , PP2A regulatory subunit B α , protein phosphatase T, protein tyrosine phosphatase-like member a, protein tyrosine phosphatase non-

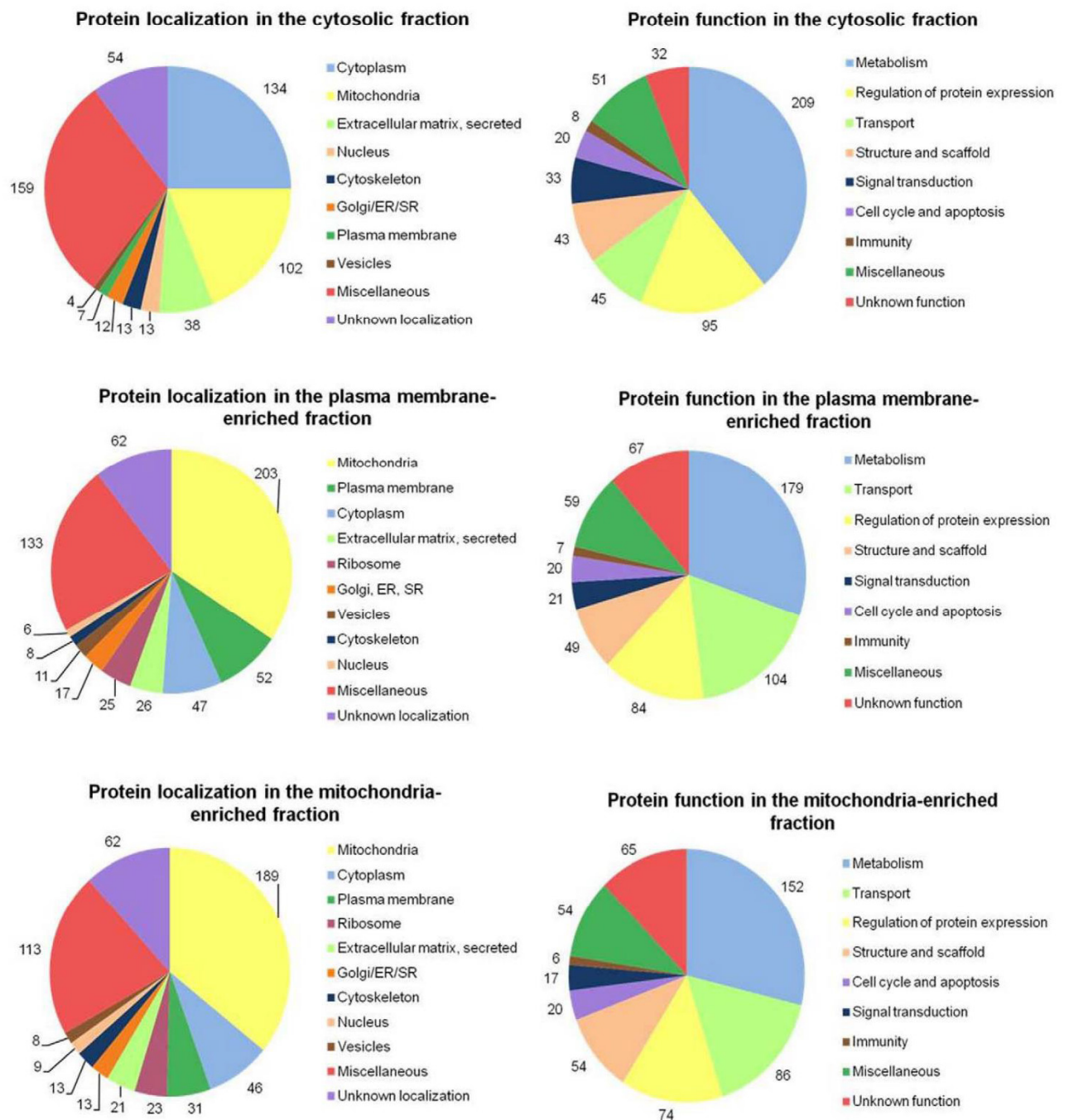


Figure 2. Classification of proteins identified in the left ventricular myocardium according to their subcellular localization and function. The proteins of each fraction (CT, PM and MT) isolated from hearts of control (C), morphine-treated (M), and morphine-withdrawn (M_{W-I} and M_{W-II}) rats were labeled by isobaric reagents provided in iTRAQ 4-plex reagent kit. After LC-MALDI analyses performed on Ultimate 3000 HPLC system and acquisition of spectra on 4800 Plus MALDI TOF/TOF analyzer, proteins were identified and quantified using Protein Pilot 4.0. Localization and function of the proteins were assigned on the basis of current annotations in the Swiss-Prot database. Sections of the pie charts represent the proportion of proteins found within each functional category. doi:10.1371/journal.pone.0047167.g002

receptor type 11, protein-tyrosine phosphatase mitochondrial 1, low molecular weight protein tyrosine phosphatase isoform A).

Interestingly, phospholipase C $\delta 1$ (PLC- $\delta 1$) was found to be up-regulated (3.2-fold) in the cytosolic fraction after morphine treatment, and 3 days of abstinence resulted in its marked down-regulation (10.7-fold). PLC- δ isoforms were shown to differ from the other PLC isoforms because they are not activated by

heterotrimeric G proteins or protein phosphorylation cascades [55]. It was proposed that this enzyme is activated by a rise in the concentration of free cytosolic calcium generated by PLC- β and further amplifies Ca^{2+} signals initiated by activation of PLC- β , γ and ϵ isoforms [56]. It also can be activated by transglutaminase II (TGII or $G\alpha_h$), which is an atypical G protein with GTPase and transglutaminase activities [57]. PLC- $\delta 1$ was shown to be an

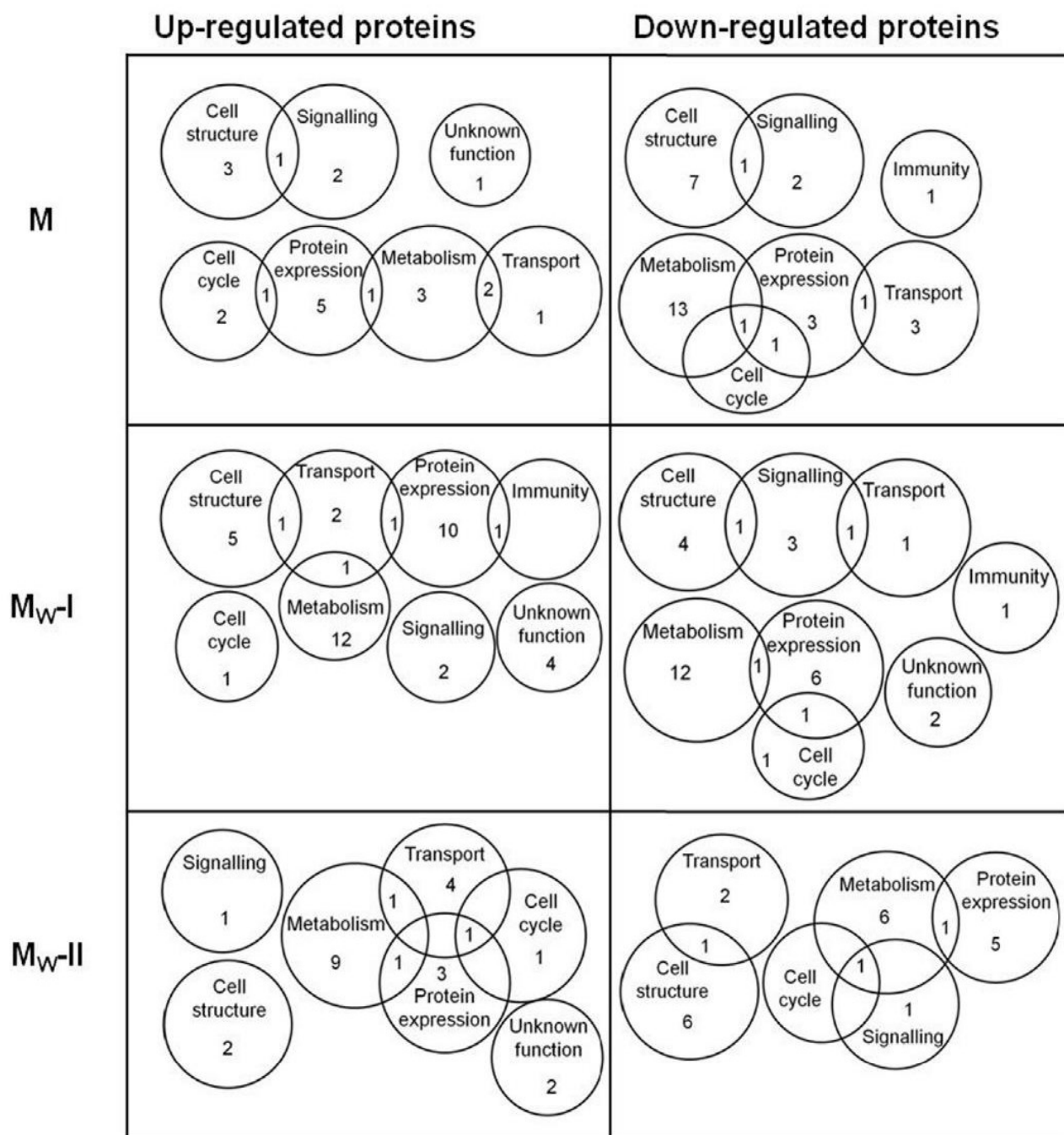


Figure 3. Venn diagrams showing the distribution of myocardial proteins in the cytosolic fraction altered by morphine treatment and withdrawal. Numbers in the individual circles or sectors refer to the number of altered proteins which were determined in the cytosolic fraction isolated from the left ventricles of morphine-treated (M) and morphine-withdrawn for 3 days (M_{w-I}) or 6 days (M_{w-II}) rats. These proteins were arranged according to their function into 16 groups.
doi:10.1371/journal.pone.0047167.g003

effector and GEF protein for TGII in the α_{1B} - and α_{1D} -adrenergic receptor pathways [55,57]. Our analyses allowed us to identify some proteins which can interact with PLC- $\delta 1$ such as importin $\beta 1$ [58], isoform of Ral protein and calmodulins [56] or proteins which can inhibit PLC- $\delta 1$ activity such as RhoA [59], but the expression levels of none of these proteins were affected neither by morphine treatment nor by subsequent drug withdrawal. Interestingly, in our previous study based on 2D mapping we found

a 2.3-fold increase in the amount of phosphatidylinositol transfer protein α (PITP α) in the cytosolic fraction after prolonged administration of morphine to rats [41]. Because previous research has shown that the presence of PITP α may enhance the activity of PLC- $\delta 1$ in HL-60 cells [60], it is highly likely that not only morphine treatment led to up-regulation of PLC- $\delta 1$ but also might have enhanced its activity. It was previously reported that PLC- $\delta 1$ has an important role in the protection mediated by tumor

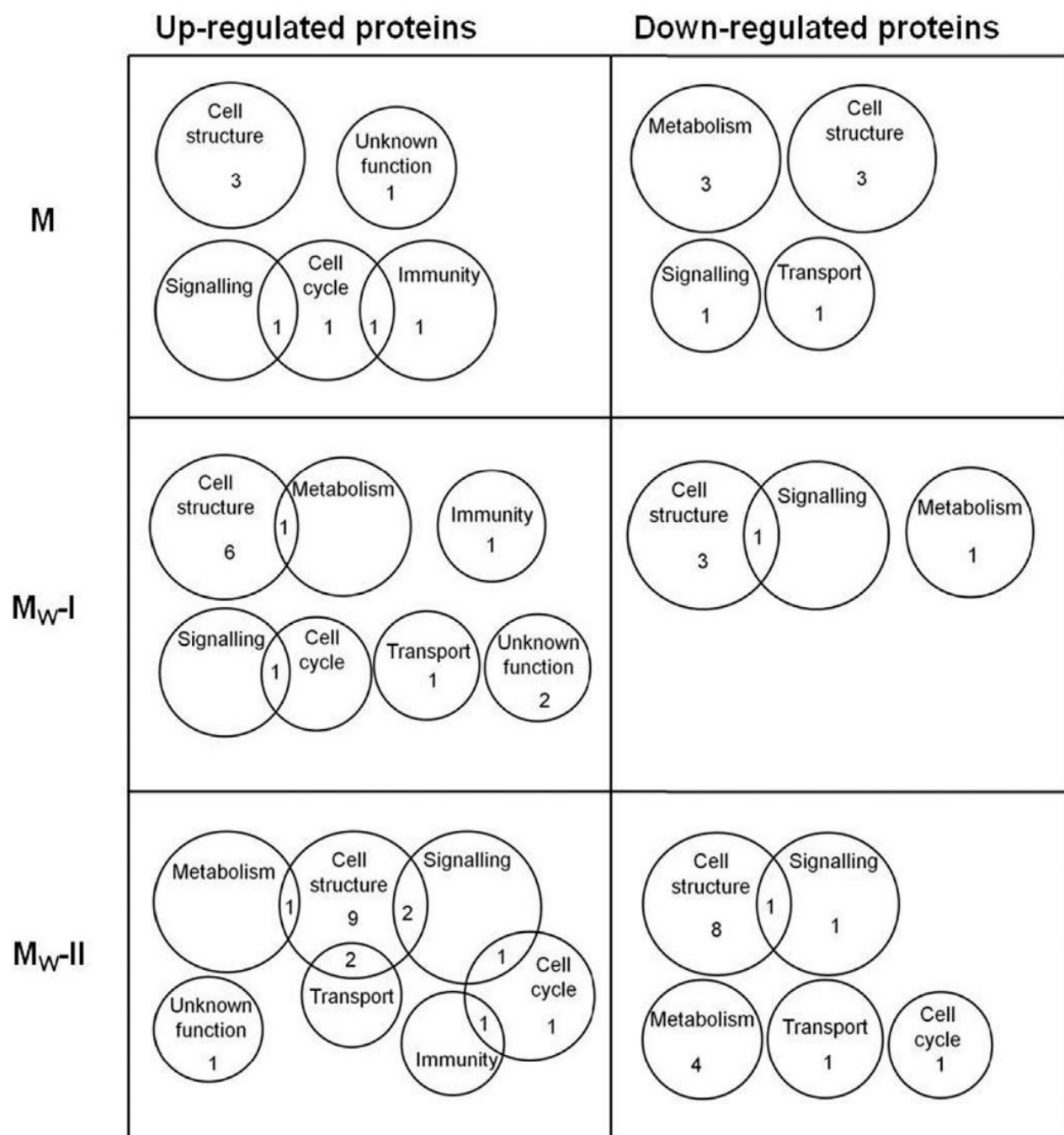


Figure 4. Venn diagrams showing the distribution of myocardial proteins in the plasma membrane-enriched fraction altered by morphine treatment and withdrawal. Numbers in the individual circles or sectors refer to the number of altered proteins which were determined in the PM-enriched fraction isolated from the left ventricles of morphine-treated (M) and morphine-withdrawn for 3 days (M_{W-I}) or 6 days (M_{W-II}) rats. These proteins were arranged according to their function into 16 groups.
doi:10.1371/journal.pone.0047167.g004

necrosis factor (TNF) receptor against adriamycin-induced cardiotoxicity [61]. The present finding of a 3.2-fold increase of PLC- $\delta 1$ in the cytosolic fraction of myocardial samples from morphine-treated rats suggests that this enzyme could also participate in the molecular mechanism of cardioprotective action of this drug. However, only future research aimed at untangling the molecular mechanism of cardioprotection conferred by morphine can prove or disprove this speculative hypothesis. Apart

from PLC- $\delta 1$, lysophospholipase 1 and phospholipase A2 activating protein were also identified by iTRAQ analysis but myocardial levels of these proteins were not altered by morphine.

It is known that the acute or chronic morphine treatment can cause the elevation of free cytosolic calcium concentration via PLC- β [62–64]. One might therefore speculate that the levels of some calcium binding proteins or proteins involved in calcium handling, transport and signaling could possibly be influenced by

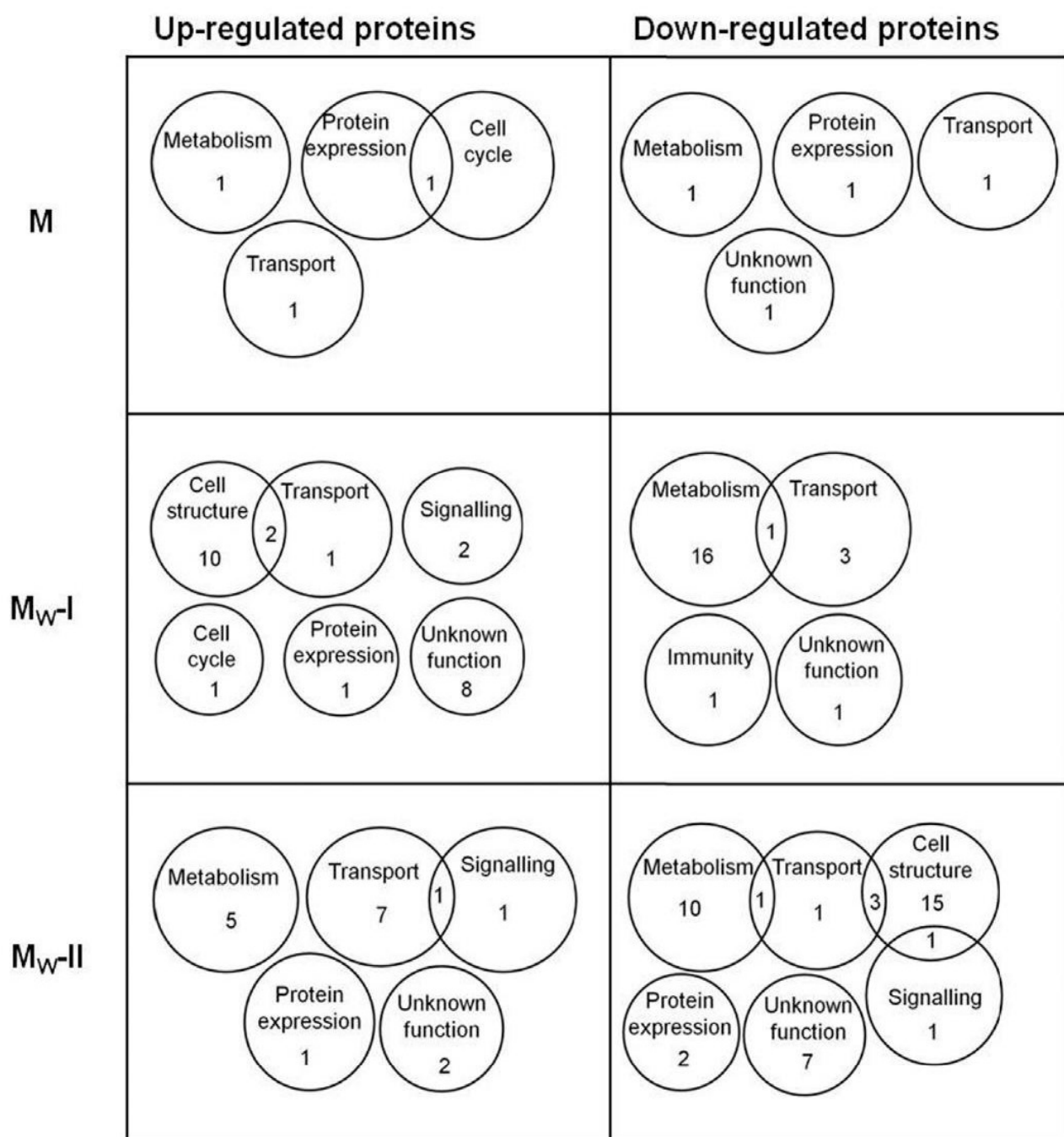


Figure 5. Venn diagrams showing the distribution of myocardial proteins in the mitochondria-enriched fraction altered by morphine treatment and withdrawal. Numbers in the individual circles or sectors refer to the number of altered proteins which were determined in the MT-enriched fraction isolated from the left ventricles of morphine-treated (M) and morphine-withdrawn for 3 days (M_w-I) or 6 days (M_w-II) rats. These proteins were arranged according to their function into 16 groups.
doi:10.1371/journal.pone.0047167.g005

morphine treatment. Nevertheless, only histidine-rich calcium protein identified in the PM-enriched fraction was significantly up-regulated (3- or 3.9-fold, respectively) after 3- or 6-day drug withdrawal. Interestingly, its level was not changed in the other two fractions prepared from samples derived from morphine-exposed animals (M, M_w-I, M_w-II), compared to the corresponding controls. The other proteins in this group (calcium binding protein, calcium regulated heat stable protein 1, calcyclin,

calmodulin 2, calnexin, calsequestrin 1, calsequestrin 2, calpain small subunit 1, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, vasopressin-activated calcium-binding mobilizing receptor protein) were not altered at all. These results suggest that if Ca²⁺ signaling pathways were affected by morphine, this effect need not necessarily be accompanied by marked quantitative changes of Ca²⁺ binding proteins.

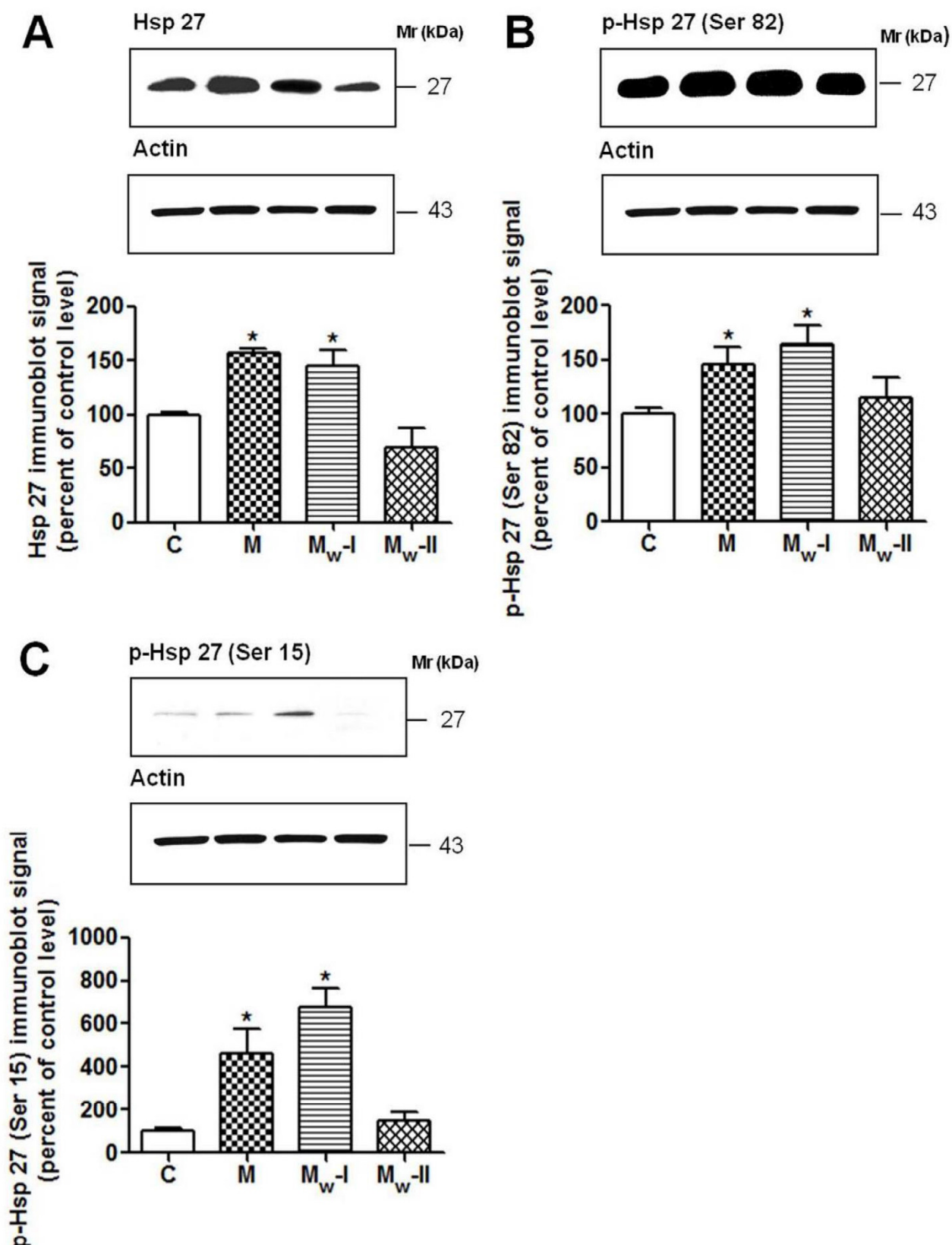


Figure 6. Immunoblot analyses of the unphosphorylated and phosphorylated forms of HSP27. Cytosolic proteins (20 μ g) isolated from the left ventricular myocardium of control (C), morphine-treated (M), and morphine-withdrawn for 3 days (M_w-I) or 6 days (M_w-II) rats were separated on 15% polyacrylamide gels by SDS-PAGE and electrotransferred onto the nitrocellulose membrane. Specific primary antibodies were used for the

detection of unphosphorylated HSP27 (A) and HSP27 phosphorylated at Ser82 (B) and Ser15 (C). Actin was used as a loading control and the relative levels of individual forms of HSP27 (HSP27, p-HSP27-Ser82 or p-HSP27-Ser15) after normalization were expressed as a percentage of the corresponding control level. Data represent the mean \pm S.E.M. of three separate experiments; * $p < 0.05$ vs control. doi:10.1371/journal.pone.0047167.g006

Proteins Involved in Apoptosis and Oxidative Stress

A number of studies dealing with morphine effects on cell viability, apoptosis and oxidative stress have been published during the past decade. It was reported that morphine treatment resulted in apoptosis in macrophages [65–66], SH-SY5Y [67] or microglia and neurons [68–69]. On the other hand, protective effects of morphine were observed in macrophages [70], astrocytes [69,71] or heart [37–38,64]. Morphine has also been shown to enhance the generation of reactive oxygen species (ROS) in macrophages [65] and SH-SY5Y [67]. Hence, it seems that morphine can cause either cell apoptosis or protection depending on the cell type and experimental context. Therefore, it is worth paying attention to potential changes of proteins involved in apoptosis, cellular protection and ROS generation.

Many proteins involved in cellular protection/apoptosis, which were detected in our present study, were not altered after morphine treatment or withdrawal, e.g. proteins that can induce apoptosis and/or activate caspases (apoptosis-inducing factor, diablo, C9 protein, B-cell associated protein 31, BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3, endonuclease G, G β_2 -like 1, reticulon-3, VDAC1, SP120), proteins that protect cells against apoptosis (CHIP28k, mitochondrial inner membrane protein, glutathione peroxidase 4 isoform A precursor, mitochondrial protein 18 kDa, prohibitin, protein DJ-1, vanin 1), proteins engaged in release of cytochrome *c* from mitochondria into the cytoplasm (Clu protein, growth hormone-inducible transmembrane protein, mitochondrial fission 1 protein, presenilin associated rhomboid like) or proteins conferring protection against release of cytochrome *c* (mitochondrial OPA1, optic atrophy 1 homolog, sulphated glycoprotein 2).

We determined four proteins possibly involved in the induction of apoptosis, expression of which was affected by morphine. Programmed cell death 5 protein was up-regulated (2.1 fold) in the cytosolic fraction after morphine treatment, dynamin 1 like was up-regulated (2.6-fold) in the cytosolic fraction after a 3-day drug abstinence period, programmed cell death 6 interacting protein was up-regulated (2.6-fold) in the cytosolic fraction after 6-day abstinence and lactate dehydrogenase A was down-regulated (3.4-fold) in the cytosolic fraction after 6-day abstinence. Interestingly, the level of the latter protein was not changed in the PM- and MT-enriched fractions. Another four proteins were found to be altered after morphine exposure or withdrawal that can play a role in protection of cells against apoptosis. Cystatin B was down-regulated (2.2-fold) and Bcl2-associated anthanogene 3 up-regulated (2.4-fold) in the cytosolic fraction after morphine treatment, prothymosin α was down-regulated (4.9-fold) in the cytosolic fraction after 3 days of drug abstinence, acetyl-CoA acyltransferase 2 was down-regulated (3.2-fold) in the MT-enriched fraction after 6 days of abstinence (its level was unchanged in the PM-enriched fraction and cytosol). These results indicate that a certain imbalance between pro- and anti-apoptotic proteins may arise in the myocardium during morphine treatment or withdrawal. However, up-regulation of programmed cell death 5 protein in the cytosol does not necessarily mean the induction of apoptosis because this protein is translocated from the cytosol to the nucleus during the early stage of apoptosis [72].

It seems that if chronic morphine treatment induced apoptosis, it would not be mediated by the formation of pores in the mitochondrial membrane and release of cytochrome *c*. OPA1

protein and mitochondrial inner membrane protein, which control the shape of mitochondrial cristae and thus may regulate cytochrome *c* redistribution [73–75], were not affected by morphine treatment or withdrawal. The expression of another protein involved in mitochondrial fusion, mitofusin-1 [73–74], was also not changed. Mitochondrial morphology thus did not seem to be affected by morphine. Moreover, no release of cytochrome *c* from mitochondria to the cytoplasm was observed after morphine treatment or withdrawal; the levels of cytochrome *c* detected in all three fractions were not altered.

Calpain-dependent proteolysis can contribute to cell death by cleavage of pro-apoptotic Bid [76]. There are two different major isoforms of calpain, μ -calpain (calpain 1) and m-calpain (calpain 2), which contain a large 80 kDa catalytic subunit and a common small 30 kDa regulatory subunit [77]. They are activated by elevation of intracellular calcium and their proteolytic activity is regulated by specific inhibitor calpastatin [77]. In our present study, a small regulatory subunit of calpain, m-calpain and calpastatin were identified. Nevertheless, the levels of these proteins were not altered by morphine treatment or withdrawal. In addition, expression of the majority of caspase and calpain substrates (α -fodrin, actin, protein phosphatase 2A, vimentin, lamin A, Ca²⁺-ATPase, G α protein, PKA, ryanodine receptors, talin, tropomyosin, tubulins, vimentin, vinculin) [78–79] identified in our study were also not altered. Only tau and troponin T were down-regulated (17.0-fold and 2.8-fold, respectively) after 3-day drug abstinence. These results indicate that calpain and caspase pathways were not significantly activated by morphine treatment or withdrawal.

Similarly, there were no significant changes in the expression levels of proteins involved in modulation of oxidative stress, such as superoxide dismutase 1, superoxide dismutase 2, glutathione peroxidase, glutathione peroxidase 4 isoform A precursor, glutaredoxin 3, glutaredoxin 5, peroxiredoxin 2, peroxiredoxin 3, peroxiredoxin 5, peroxiredoxin 6, antioxidant enzyme B166, catalase, protein DJ-1, thioredoxin 1, thioredoxin like protein 1, thioredoxin domain containing 17, thioredoxin reductase 2, protein disulfide isomerase A6, CDGSH iron sulfur domain containing protein 1, dihydrolipoyl dehydrogenase mitochondrial.

HSPs

Some members of the family of heat shock proteins (HSPs) were markedly affected by morphine treatment or withdrawal. Alterations in HSPs expression were observed mainly in the cytosolic fraction and less in the MT-enriched fraction. No changes were found in the PM-enriched fraction. Heat shock 10 kDa protein 1 (HSP10) was up-regulated (2.1-fold) in the cytosolic fraction after morphine treatment. Interestingly, this protein was up-regulated (2.3-fold) in the cytosol and down-regulated in the MT-enriched fraction (2.1-fold) after 6-day drug abstinence. These results suggest that HSP10 is affected by morphine and that subsequent withdrawal can cause its redistribution from the cytoplasm to membrane compartments.

Heat shock 60 kDa protein (HSP60) was significantly up-regulated only in the cytosolic fraction (and not in both membrane fractions) after morphine treatment (2.0-fold) and a 6-day morphine abstinence (2.0-fold). Similarly to HSP10, a slight redistribution of HSP60 to the MT-enriched fraction (1.8-fold increase) was found after 6-day morphine abstinence, which may

imply that both proteins may undergo a common fate. The anti-apoptotic effect of both HSP10 and HSP60 has been well established in several studies in which over-expression of these proteins protected myocytes and H9C2 cells against ischemic injury [80–81]. In addition, HSP60 have been shown to interact with Bax/Bak proteins, thus providing protection against apoptosis [82].

Heat shock 70 kDa protein 1A/1B (HSP70) was markedly up-regulated in the cytosolic fraction (15.9-fold) as well as MT-enriched fraction (2.3-fold) after morphine treatment. This protein was also up-regulated (6.8-fold) in the cytosolic fraction after 6 days of morphine abstinence. Importantly, it has been demonstrated that over-expression of HSP70 protects the myocardium from ischemic injury [83].

Two members of the family of small heat shock proteins with cell protective effects, heat shock protein 27 kDa protein 1 (HSP27, HSPB1) and α -B crystallin [84–85], were also found to be altered. Both HSP27 and α -B crystallin were up-regulated (2.6- and 2.1-fold, respectively) in the cytosolic fraction after morphine treatment. α -B crystallin was up-regulated (2.1-fold) in the cytosolic fraction also after a 6-day drug abstinence. It was shown that these proteins can be phosphorylated and activated *via* the MAPK p38 (MAPK14)/MAPKAP-2 pathway [86–87]. Interestingly, in our study MAPK14 (isoform CRA_b) was found to be up-regulated (2.5-fold) in the cytosolic fraction after morphine treatment. Therefore, it is plausible to assume that cardioprotection induced by morphine may occur at least partly via the MAPK p38/MAPKAP-2/HSP27 or α -B crystalline pathway.

In order to determine whether HSP27 could be activated by morphine treatment or withdrawal, its phosphorylation state was assessed by Western blotting using specific antibodies against phosphorylated amino acids Ser82 and Ser15 of HSP27 (Fig. 6). Both these sites can be phosphorylated by MAPKAP-2 and the major site of phosphorylation of this protein is Ser82 [88]. The increased expression levels of HSP27 in samples from morphine treated animals were verified by Western blotting (Fig. 6A). The amount of HSP27 phosphorylated on Ser15 and, to a lesser extent, on Ser82 was also increased (Fig. 6B,C). Although HSP27 was phosphorylated at both phosphorylation sites after morphine treatment, 3-day drug abstinence further increased its phosphorylation. By contrast, after 6 days of abstinence HSP27 phosphorylation returned to normal values. These results partly support some recently published findings. Two recent studies have reported that naloxone-precipitated morphine withdrawal induced activation of HSP27 by phosphorylation at Ser15 but not at Ser82 [89–90]. Moreover, although chronic morphine treatment led to increased expression of HSP27, enhanced phosphorylation and activation of this protein was not observed [89–90]. The partial discrepancy between these and our present observations may be explained by different experimental conditions. Nevertheless, it can be concluded that morphine withdrawal can strongly enhance phosphorylation of HSP27 at Ser15, irrespective whether it is spontaneous (in the case of morphine abstinence) or elicited by treatment with the opioid inverse agonist naloxone.

In order to determine whether HSP27 could be activated after morphine treatment or withdrawal, its phosphorylation was assessed by immunoblotting with specific antibodies against phosphorylated amino acids Ser82 and Ser15 of HSP27 (Fig. 2). Both sites can be phosphorylated by MAPKAP-2 and the major site of phosphorylation of this protein is Ser82 [88]. It was verified using antibodies against HSP27 that morphine treatment led to up-regulation of HSP27. Nevertheless, it resulted also in phosphorylation of Ser15 and in less extent in phosphorylation of Ser82 (Fig. 2).

Non-phosphorylated HSP27 was shown to exist in the form of large oligomers and its phosphorylation leads to dissociation of these oligomers [91]. Phosphorylation and oligomerization of HSP27 is connected with modulation of the interaction between HSP27 and actin [91–92]. While the non-phosphorylated HSP27 can block actin polymerization, the phosphorylation of HSP27 is related to re-organization of actin-based cytoskeletal structures [88]. It has been suggested that this re-organization of the actin cytoskeleton induced by phosphorylation of HSP27 could lead to cytoprotection due to stabilization of actin filaments [93]. The phosphorylation and activation of HSP27 might be also related to the observed down-regulation of tau after 3 days of morphine abstinence. HSP27 and α -B crystallin can interact with microtubules and neurofilaments and protect against protein aggregation [94]. Both proteins can interact with pathological hyperphosphorylated tau and thus facilitate its dephosphorylation and degradation. This process was observed mainly in studies dealing with Alzheimer disease [94–96].

Conclusions and Future Directions

This work follows up our previous research focused on the consequences of prolonged morphine administration on the rat heart [41] and further elaborates this issue. Results of our present proteomic study clearly indicate that iTRAQ approach may yield a wealth of information regarding the effect of morphine on the cardiac proteome. Quantitative analysis of proteomics data obtained by this method revealed a number of significant changes induced by both morphine exposure and withdrawal. An important outcome from this study is the realization that the protein and hence gene expression responses to morphine in the heart are quite complex. A similarly wide-ranging response to morphine has been previously observed in brain tissue.

A number of significant changes found in the expression of different myocardial proteins due to morphine treatment suggest that the potential cardiac effects of this drug should be carefully taken into account when using it for medical purposes. Importantly, as can be seen from this study, morphine withdrawal may apparently have even a greater impact on the heart proteome than the use of this compound itself. Hence, morphine should be considered as a drug with potentially profound effects on cardiac protein expression profiling, which may have been difficult to appreciate so far. Future studies should elucidate whether and to what extent morphine-induced changes in protein expression may play a specific role in the regulation of heart function.

Supporting Information

Table S1 Complete list of the myocardial proteins altered after morphine treatment or withdrawal. The proteins whose expression levels were altered at least twice after morphine treatment (M) or drug withdrawal for 3 days (M_{W-I}) or 6 days (M_{W-II}) compared to controls were arranged according to their function into several groups. Expression values of up-regulated (↑) or down-regulated (↓) proteins are expressed as fold change from untreated controls. Number of accession (gi numbers from GenBank/EMBL/DBJ databases) and fraction in which protein alteration was detected are quoted for each protein (CS, cytosol; PM, plasma membrane-enriched fraction; MT, mitochondria-enriched fraction). %Cov, the percentage of matching amino acids from the identified peptides divided by the total number of amino acids in the sequence. Peptides, number of unique peptides per identified protein. The occurrence of individual proteins in other fraction(s) without alterations after morphine treatment or withdrawal is mentioned in Notes noted

using the following markings: (1) CS, no change; (2) PM, no change; (3) MT, no change; (4) CS+PM, no change; (5) PM+MT, no change.
(PDF)

Table S2 Complete list of the myocardial proteins whose levels were not significantly altered after morphine treatment or withdrawal. The proteins whose expression levels were not significantly altered after morphine treatment (M) or withdrawal for 3 days (M_{W-I}) or 6 days (M_{W-II}) compared to controls were arranged according to their function into several groups. Number of accession (gi numbers from GenBank/EMBL/DBJ databases) and fraction in which the

protein was detected are quoted for each protein (CS, cytosol; PM, plasma membrane-enriched fraction; MT, mitochondria-enriched fraction). %Cov, the percentage of matching amino acids from identified peptides divided by the total number of amino acids in the sequence. Peptides, number of unique peptides per identified protein.
(PDF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: J. Novotny ZD. Performed the experiments: ZD JS J. Neckar. Analyzed the data: ZD JS PJ. Wrote the paper: ZD FK J. Novotny.

References

- Flemming K (2010) The use of morphine to treat cancer-related pain: a synthesis of quantitative and qualitative research. *J Pain Symptom Manage* 39: 139–154.
- Vallejo R, Barkin RL, Wang VC (2011) Pharmacology of opioids in the treatment of chronic pain syndromes. *Pain Physician* 14: E343–360.
- Gregori SD, Gregori MD, Ranzani GN, Allegrì M, Minella C, et al. (2012) Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metab Brain Dis* 27: 1–5.
- Kieffer BL, Evans CJ (2009) Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1: 205–212.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, et al. (1994) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350: 412–438.
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18: 22–29.
- Narita M, Funada M, Suzuki T (2001) Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacol Ther* 89: 1–15.
- Manchikanti L, Atluri S, Trescot AM, Giordano J (2008) Monitoring opioid adherence in chronic pain patients: tools, techniques, and utility. *Pain Physician* 11: S155–180.
- Wang J, Yuan W, Li MD (2011) Genes and pathways co-associated with the exposure to multiple drugs of abuse, including alcohol, amphetamine/methamphetamine, cocaine, marijuana, morphine, and/or nicotine: a review of proteomics analyses. *Mol Neurobiol* 44: 269–286.
- Gintzler AR, Chakrabarti S (2006) Post-opioid receptor adaptations to chronic morphine: altered functionality and associations of signaling molecules. *Life Sci* 79: 717–722.
- Christie MJ (2008) Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* 154: 384–396.
- Nestler EJ (2004) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 24–32.
- Fan JW, Tien LT, Tanaka S, Ma T, Chudapongse N, et al. (2003) Changes in the brain kappa-opioid receptor levels of rats in withdrawal from physical dependence upon butorphanol. *Neuroscience* 121: 1063–1074.
- Murray F, Harrison NJ, Grimwood S, Bristow LJ, Hutson PH (2007) Nucleus accumbens NMDA receptor subunit expression and function is enhanced in morphine-dependent rats. *Eur J Pharmacol* 562: 191–197.
- Chen Y, Jiang Y, Yue W, Zhou Y, Lu L, et al. (2008) Chronic, but not acute morphine treatment, up-regulates alpha-Ca2+/calmodulin dependent protein kinase II gene expression in rat brain. *Neurochem Res* 33: 2092–2098.
- Mickiewicz AL, Napier TC (2011) Repeated exposure to morphine alters surface expression of AMPA receptors in the rat medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 33: 259–265.
- Hamlin AS, McNally GP, Osborne PB (2007) Induction of c-Fos and zif268 in the nociceptive amygdala parallel abstinence hyperalgesia in rats briefly exposed to morphine. *Neuropharmacology* 53: 330–343.
- Kaplan GB, Leite-Morris KA, Fan W, Young AJ, Guy MD (2011) Opiate sensitization induces FosB/DeltaFosB expression in prefrontal cortical, striatal and amygdala brain regions. *PLoS One* 6: e23574.
- Boronat MA, Garcia-Fuster MJ, Garcia-Sevilla JA (2001) Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *Br J Pharmacol* 134: 1263–1270.
- Emetario EP, Tramullas M, Hurlle MA (2006) Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal. *J Neurosci Res* 83: 1352–1361.
- Marie-Claire C, Courtin C, Roques BP, Noble F (2004) Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. *Neuropsychopharmacology* 29: 2208–2215.
- Ammon-Treiber S, Holt V (2005) Morphine-induced changes of gene expression in the brain. *Addict Biol* 10: 81–89.
- Prokai L, Zharikova AD, Stevens SM Jr (2005) Effect of chronic morphine exposure on the synaptic plasma-membrane subproteome of rats: a quantitative protein profiling study based on isotope-coded affinity tags and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 40: 169–175.
- Bierczynska-Krzysik A, Bonar E, Drabik A, Noga M, Suder P, et al. (2006) Rat brain proteome in morphine dependence. *Neurochem Int* 49: 401–406.
- Bierczynska-Krzysik A, Pradeep John JP, Silberring J, Kotlinska J, Dylag T, et al. (2006) Proteomic analysis of rat cerebral cortex, hippocampus and striatum after exposure to morphine. *Int J Mol Med* 18: 775–784.
- Li KW, Jimenez CR, van der Schors RC, Hornshaw MP, Schoffelemeier AN, et al. (2006) Intermittent administration of morphine alters protein expression in rat nucleus accumbens. *Proteomics* 6: 2003–2008.
- Moron JA, Abul-Husn NS, Rozenfeld R, Dolios G, Wang R, et al. (2007) Morphine administration alters the profile of hippocampal postsynaptic density-associated proteins: a proteomics study focusing on endocytic proteins. *Mol Cell Proteomics* 6: 29–42.
- Yang L, Sun ZS, Zhu YP (2007) Proteomic analysis of rat prefrontal cortex in three phases of morphine-induced conditioned place preference. *J Proteome Res* 6: 2239–2247.
- Bodzon-Kulakowska A, Suder P, Mak P, Bierczynska-Krzysik A, Lubec G, et al. (2009) Proteomic analysis of striatal neuronal cell cultures after morphine administration. *J Sep Sci* 32: 1200–1210.
- Abul-Husn NS, Annangudi SP, Ma'ayan A, Ramos-Ortolaza DL, Stockton SD Jr, et al. (2011) Chronic morphine alters the presynaptic protein profile: identification of novel molecular targets using proteomics and network analysis. *PLoS One* 6: e25535.
- Bu Q, Yang Y, Yan G, Hu Z, Hu C, et al. (2012) Proteomic analysis of the nucleus accumbens in rhesus monkeys of morphine dependence and withdrawal intervention. *J Proteomics* 75: 1330–1342.
- Neasta J, Uttenweiler-Joseph S, Chaoui K, Monsarrat B, Meunier JC, et al. (2006) Effect of long-term exposure of SH-SY5Y cells to morphine: a whole cell proteomic analysis. *Proteome Sci* 4: 23.
- Xu H, Wang X, Zimmerman D, Boja ES, Wang J, et al. (2005) Chronic morphine up-regulates G alpha12 and cytoskeletal proteins in Chinese hamster ovary cells expressing the cloned mu opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 248–255.
- Suder P, Bodzon-Kulakowska A, Mak P, Bierczynska-Krzysik A, Daszykowski M, et al. (2009) The proteomic analysis of primary cortical astrocyte cell culture after morphine administration. *J Proteome Res* 8: 4633–4640.
- Shanazari AA, Aslani Z, Ramshini E, Alaei H (2011) Acute and chronic effects of morphine on cardiovascular system and the baroreflex sensitivity during severe increase in blood pressure in rats. *ARYA Atheroscler* 7: 111–117.
- Pang PS, Komajda M, Gheorghide M (2010) The current and future management of acute heart failure syndromes. *Eur Heart J* 31: 784–793.
- Murphy GS, Szokol JW, Marymont JH, Avram MJ, Vender JS (2006) Opioids and cardioprotection: the impact of morphine and fentanyl on recovery of ventricular function after cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 20: 493–502.
- Li R, Wong GT, Wong TM, Zhang Y, Xia Z, et al. (2009) Intrathecal morphine preconditioning induces cardioprotection via activation of delta, kappa, and mu opioid receptors in rats. *Anesth Analg* 108: 23–29.
- Peart JN, Hoe LE, Gross GJ, Headrick JP (2011) Sustained ligand-activated preconditioning via delta-opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 274–281.
- Skrabalova J, Neckar J, Hejnova L, Bartonova I, Kolar F, et al. (2012) Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenylyl cyclase signaling in rats. *Pharmacol Rep* 64: 351–359.
- Drastichova Z, Skrabalova J, Neckar J, Kolar F, Novotny J (2011) Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium. *J Biomed Sci* 18: 89.
- Yan W, Chen SS (2005) Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4: 27–38.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, et al. (2004) Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3: 1154–1169.

44. Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF (2006) Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cIcAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res* 5: 651–658.
45. Shadforth IP, Dunkley TP, Lilley KS, Bessant C (2005) i-Tracker: for quantitative proteomics using iTRAQ. *BMC Genomics* 6: 145.
46. Ernault E, Gamelin E, Guette C (2008) Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation. *Proteome Sci* 6: 27.
47. Polisetty RV, Gautam P, Sharma R, Harsha HC, Nair SC, et al. (2012) LC-MS/MS analysis of differentially expressed glioblastoma membrane proteome reveals altered calcium signaling and other protein groups of regulatory functions. *Mol Cell Proteomics* 11: M111 013565.
48. Molloy MP (2000) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem* 280: 1–10.
49. Rabilloud T (2009) Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult. *Electrophoresis* 30 Suppl 1: S174–180.
50. Chung JH, Choi HJ, Kim SY, Hong KS, Min SK, et al. (2011) Proteomic and biochemical analyses reveal the activation of unfolded protein response, ERK-1/2 and ribosomal protein S6 signaling in experimental autoimmune myocarditis rat model. *BMC Genomics* 12: 520.
51. Huang QY, Fang CW, Huang HQ (2011) Alteration of heart tissue protein profiles in acute cadmium-treated scallops *Patinopecten yessoensis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 60: 90–98.
52. Seabra MC, Wasmeier C (2004) Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 16: 451–457.
53. Shisheva A, Chinni SR, DeMarco C (1999) General role of GDP dissociation inhibitor 2 in membrane release of Rab proteins: modulations of its functional interactions by in vitro and in vivo structural modifications. *Biochemistry* 38: 11711–11721.
54. Quest AF, Leyton L, Parraga M (2004) Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem Cell Biol* 82: 129–144.
55. Rebecchi MJ, Pentyala SN (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 80: 1291–1335.
56. Sidhu RS, Clough RR, Bhullar RP (2005) Regulation of phospholipase C-delta 1 through direct interactions with the small GTPase Ral and calmodulin. *J Biol Chem* 280: 21933–21941.
57. Baek KJ, Kang S, Damron D, Im M (2001) Phospholipase Cdelta 1 is a guanine nucleotide exchanging factor for transglutaminase II (alpha h) and promotes alpha 1B-adrenoreceptor-mediated GTP binding and intracellular calcium release. *J Biol Chem* 276: 5591–5597.
58. Yagisawa H (2006) Nucleocytoplasmic shuttling of phospholipase C-delta 1: a link to Ca²⁺. *J Cell Biochem* 97: 233–243.
59. Hodson EA, Ashley CC, Hughes AD, Lymn JS (1998) Regulation of phospholipase C-delta by GTP-binding proteins-rhoA as an inhibitory modulator. *Biochim Biophys Acta* 1403: 97–101.
60. Allen V, Swigart P, Cheung R, Cockcroft S, Katan M (1997) Regulation of inositol lipid-specific phospholipase cdelta by changes in Ca²⁺ ion concentrations. *Biochem J* 327 (Pt 2): 545–552.
61. Lien YC, Noel T, Liu H, Stromberg AJ, Chen KC, et al. (2006) Phospholipase C-delta 1 is a critical target for tumor necrosis factor receptor-mediated protection against adriamycin-induced cardiac injury. *Cancer Res* 66: 4329–4338.
62. Quillan JM, Carlson KW, Song C, Wang D, Sadee W (2002) Differential effects of mu-opioid receptor ligands on Ca(2+) signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 1002–1012.
63. Chakrabarti S, Liu NJ, Gintzler AR (2003) Reciprocal modulation of phospholipase Cbeta isoforms: adaptation to chronic morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13686–13691.
64. Barrere-Lemaire S, Combes N, Sportouch-Dukhan C, Richard S, Nargeot J, et al. (2005) Morphine mimics the antiapoptotic effect of preconditioning via an Ins(1,4,5)P3 signaling pathway in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H83–88.
65. Bhat RS, Bhaskaran M, Mongia A, Hitosugi N, Singhal PC (2004) Morphine-induced macrophage apoptosis: oxidative stress and strategies for modulation. *J Leukoc Biol* 75: 1131–1138.
66. Singhal PC, Bhaskaran M, Patel J, Patel K, Kasinath BS, et al. (2002) Role of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Fas-Fas ligand interaction in morphine-induced macrophage apoptosis. *J Immunol* 168: 4025–4033.
67. Lin X, Wang YJ, Li Q, Hou YY, Hong MH, et al. (2009) Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of mitochondria-dependent pathway. *FEBS J* 276: 2022–2036.
68. Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G (2002) Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *J Neurosci* 22: 7650–7661.
69. Hu S, Sheng WS, Lokensgard JR, Peterson PK (2002) Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. *Neuropharmacology* 42: 829–836.
70. Ohara T, Itoh T, Takahashi M (2005) Immunosuppression by morphine-induced lymphocyte apoptosis: is it a real issue? *Anesth Analg* 101: 1117–1122, table of contents.
71. Kim MS, Cheong YP, So HS, Lee KM, Kim TY, et al. (2001) Protective effects of morphine in peroxynitrite-induced apoptosis of primary rat neonatal astrocytes: potential involvement of G protein and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase). *Biochem Pharmacol* 61: 779–786.
72. Chen Y, Sun R, Han W, Zhang Y, Song Q, et al. (2001) Nuclear translocation of PDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis? *FEBS Lett* 509: 191–196.
73. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Bezoussenko GV, et al. (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126: 177–189.
74. Chen L, Gong Q, Stice JP, Knowlton AA (2009) Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res* 84: 91–99.
75. John GB, Shang Y, Li L, Renken C, Mannella CA, et al. (2005) The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell* 16: 1543–1554.
76. Gill C, Mestril R, Samali A (2002) Losing heart: the role of apoptosis in heart disease: a novel therapeutic target? *FASEB J* 16: 135–146.
77. Wu HY, Lynch DR (2006) Calpain and synaptic function. *Mol Neurobiol* 33: 215–236.
78. Chan SL, Mattson MP (1999) Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res* 58: 167–190.
79. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev* 83: 731–801.
80. Lin KM, Lin B, Lian IY, Mestril R, Scheffler IE, et al. (2001) Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation* 103: 1787–1792.
81. Lau S, Patnaik N, Sayen MR, Mestril R (1997) Simultaneous overexpression of two stress proteins in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against ischemia-induced injury. *Circulation* 96: 2287–2294.
82. Kirchhoff SR, Gupta S, Knowlton AA (2002) Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury. *Circulation* 105: 2899–2904.
83. Gray CC, Amrani M, Yacoub MH (1999) Heat stress proteins and myocardial protection: experimental model or potential clinical tool? *Int J Biochem Cell Biol* 31: 559–573.
84. Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, Brunton LL, Dillmann WH (1997) Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* 96: 4343–4348.
85. Ray PS, Martin JL, Swanson EA, Otani H, Dillmann WH, et al. (2001) Transgene overexpression of alphaB crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion. *FASEB J* 15: 393–402.
86. Dokas LA, Malone AM, Williams FE, Nauli SM, Messer WS Jr (2011) Multiple protein kinases determine the phosphorylated state of the small heat shock protein, HSP27, in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuropharmacology* 61: 12–24.
87. Hoover HE, Thuerauf DJ, Martindale JJ, Glembotski CC (2000) alpha B-crystallin gene induction and phosphorylation by MKK6-activated p38. A potential role for alpha B-crystallin as a target of the p38 branch of the cardiac stress response. *J Biol Chem* 275: 23825–23833.
88. Bitar KN (2002) HSP27 phosphorylation and interaction with actin-myosin in smooth muscle contraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G894–903.
89. Almela P, Martinez-Laorden E, Atucha NM, Milanes MV, Laorden ML (2011) Naloxone-precipitated morphine withdrawal evokes phosphorylation of heat shock protein 27 in rat heart through extracellular signal-regulated kinase. *J Mol Cell Cardiol* 51: 129–139.
90. Martinez-Laorden E, Hurl MA, Milanes MV, Laorden ML, Almela P (2012) Morphine withdrawal activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and heat shock protein 27 in the left ventricle: Role of extracellular signal-regulated kinase. *J Pharmacol Exp Ther*.
91. Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, Guimond A, Landry J (1999) HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J Biol Chem* 274: 9378–9385.
92. Benndorf R, Hayek K, Ryazantsev S, Wieske M, Behlke J, et al. (1994) Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J Biol Chem* 269: 20780–20784.
93. Robinson AA, Dunn MJ, McCormack A, dos Remedios C, Rose ML (2010) Protective effect of phosphorylated Hsp27 in coronary arteries through actin stabilization. *J Mol Cell Cardiol* 49: 370–379.
94. Shimura H, Miura-Shimura Y, Kosik KS (2004) Binding of tau to heat shock protein 27 leads to decreased concentration of hyperphosphorylated tau and enhanced cell survival. *J Biol Chem* 279: 17957–17962.
95. Sahara N, Maeda S, Yoshiike Y, Mizoroki T, Yamashita S, et al. (2007) Molecular chaperone-mediated tau protein metabolism counteracts the formation of granular tau oligomers in human brain. *J Neurosci Res* 85: 3098–3108.
96. Bjorkdahl C, Sjogren MJ, Zhou X, Concha H, Avila J, et al. (2008) Small heat shock proteins Hsp27 or alphaB-crystallin and the protein components of neurofibrillary tangles: tau and neurofilaments. *J Neurosci Res* 86: 1343–1352.

10. 4. Příloha D

Protective effect of morphine against the oxidant-induced injury in H9c2 cells

2018

Cardiovascular Toxicology

18(4), 374-385.

Skrabalova, J., Karlovska, I., Hejnova, L., Novotny, J.



Protective Effect of Morphine Against the Oxidant-Induced Injury in H9c2 Cells

Jitka Skrabalova¹ · Ivana Karlovska¹ · Lucie Hejnova¹ · Jiri Novotny¹

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

There are some indications that morphine may exert myocardial protective effects under certain conditions. The aim of the present study was to investigate the effect of morphine on viability and oxidative state of H9c2 cells (rat cardiomyoblasts) influenced by oxidative stress that was elicited by exposure to *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP). Our experiments showed that pretreatment with morphine before the addition of *t*-BHP markedly improved cell viability. Morphine was able to increase total antioxidant capacity of H9c2 cells and to reduce the production of reactive oxygen species, protein carbonylation, and lipid peroxidation. Cellular damage caused by *t*-BHP was associated with low levels of p38 MAPK and GSK-3 β phosphorylation. Pretreatment with morphine augmented p38 phosphorylation, and the increased phospho-p38/p38 ratio was preserved even in the presence of *t*-BHP. Morphine did not change the level of GSK-3 β phosphorylation, but interestingly, the phospho-GSK-3 β /GSK-3 β ratio significantly increased after subsequent incubation with *t*-BHP. Furthermore, morphine exposure resulted in upregulation of the antioxidant enzyme catalase. The protective effect of morphine was abrogated by the addition of the PI3K inhibitor wortmannin and/or p38 MAPK inhibitor SB203580. It can be concluded that morphine may protect H9c2 cells against oxidative stress and that this protection is at least partially mediated through activation of the p38 MAPK and PI3K/GSK-3 β pathways.

Keywords H9c2 cells · Morphine · *Tert*-butyl hydroperoxide · Oxidative stress · Reactive oxygen species · Apoptosis · p38 MAPK · GSK-3 β

Introduction

Morphine belongs to a large family of drugs known as narcotic analgesics. Despite the advancement in pain medicine, morphine with other opioids still remains the most powerful and widely used analgesic available [1–3]. Interestingly, besides its potent antinociceptive effects, morphine may apparently confer protection against anoxia/reoxygenation injury in some cells and tissues. In 1996, Schulz et al. [4] reported that morphine is able to significantly reduce tissue damage that occurs during myocardial ischemia. Since that time, a number of studies have been conducted in an attempt to delineate the molecular mechanisms underlying opioid-induced cardioprotection [5–7]. There are some indications that glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibition

mediated via phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), target of rapamycin (TOR) [8], JAK/STAT [9], or the NO/cGMP/PKG pathway [10] can play a central role in morphine-induced protection. Inactivation of GSK-3 β prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), thereby improving mitochondrial respiratory function and reducing the production of reactive oxygen species (ROS) [11, 12]. The p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) signaling cascade is another important pathway potentially involved in opioid-induced cardioprotection [13, 14]. However, there is only one study suggesting that activation of p38 MAPK may be essential to cardioprotection afforded by morphine [15].

The enhanced ROS generation, which takes place during myocardial ischemia and reperfusion, is one of the main risk factors implicated in tissue injury [16]. According to a recent study of Borges et al. [17], morphine can serve as a potent antioxidant capable of strengthening the cellular antioxidant capacity [18]. Nevertheless, as summarized previously, the impact of morphine on cellular redox balance may

✉ Jiri Novotny
jiri.novotny@natur.cuni.cz

¹ Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

vary according to concrete circumstances, and it depends on multiple factors, such as species, age, sex, tissue type, dose and length of exposure, and simultaneous administration of other drugs [19]. Previous studies performed on H9c2 cells, a rat cardiomyoblast cell line, demonstrated that treatment of these cells with morphine (1 μ M to 10 mM) does not lead to excessive ROS formation [20] and can diminish arsenic trioxide-induced ROS production [21]. Moreover, morphine was found to increase viability of H9c2 cells after simulated ischemia and reperfusion and to prevent oxidative stress-caused mitochondrial damage through increased ROS production [22, 23]. According to these studies, ROS play an important role in activation of the PI3K/Akt signaling pathway and may thus participate in morphine-mediated cytoprotection.

In the present study, we set out to investigate the presumed protective effect of morphine on H9c2 cell viability during oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP). It has been shown previously that exposure of H9c2 cells to *t*-BHP may induce intracellular oxidative stress, which is accompanied by distinct morphological alterations, such as translocation of phosphatidylserine to the outer leaflet of the plasma membrane and membrane blebbing, one of the defined features of apoptosis [24]. In addition to that, high concentrations of *t*-BHP or prolonged exposure to this compound were found to lead to loss of cell membrane integrity and necrotic cell death. Besides examining the effects of different doses of morphine, in this study we also aimed to explore the role of PI3K/GSK-3 β and p38 MAPK pathways in the molecular mechanism underlying the cytoprotective actions of morphine. For this purpose, cells were preincubated with selective inhibitors of these two signaling pathways prior to the addition of morphine. Finally, we examined the impact of morphine on the functional state of GSK-3 β and p38 MAPK, as well as on the expression of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase. Our results indicated that morphine can quite effectively prevent the adverse consequences of *t*-BHP-induced oxidative stress in H9c2 cells.

Materials and Methods

Compounds and Reagents

Fetal bovine serum was purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA), acrylamide and bis-acrylamide were from SERVA (Heidelberg, Germany), complete protease inhibitor and PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktails were from Roche Life Science (Indianapolis, IN, USA), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA), Protran BA85 nitrocellulose membrane was from GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfort,

Buckinghamshire, UK), and SuperSignal West Dura chemiluminescent substrate was from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA). Antibodies against Bcl-2, Bax, p38 α MAPK, phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), GSK-3 β , catalase, and superoxide dismutase 1 (SOD1) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-phospho-GSK-3 β (pSer9) antibody was obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Annexin V Dyomics 647 was purchased from Apronex Biotechnologies (Vestec, Czech Republic). All other chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA), and they were of the highest purity available.

Cell Culture and Drug Treatment

H9c2 cardiomyoblasts (ATCC, CRL-1446) from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antimycotic solution at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was replaced every 2–3 days, and cells were subcultured at 70% confluence. All experiments were performed on cells at 70–80% confluence. At least 1 h before experiment, the culture medium was replaced with starvation medium (DMEM supplemented with 1% FBS). Cells were incubated in phosphate-buffered saline (PBS) (CON) or in PBS containing morphine (MOR) for 15 min and subsequently exposed to oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) for 15 h. For cell viability and cytotoxicity assays, *t*-BHP was used over a broad range of concentrations (100–500 μ M) selected on the basis of preliminary investigations. In some experiments, cells were pretreated with 10 μ M SB203580 (SB), a specific inhibitor of the p38 MAPK pathway, or with 1 μ M wortmannin (W), PI3K inhibitor, or with a combination of both these inhibitors (SB + W) for 1 h prior to the addition of morphine.

Cell Viability Assay

Cell viability was assessed by a rapid MTT colorimetric assay described by Mosmann [25]. The assay was performed on cells grown in 96-well tissue culture plates. After treatment with *t*-BHP, the culture medium was replaced by 100 μ l of phenol red-free DMEM supplemented with 1% FBS and cells incubated in the presence of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) at a concentration of 0.2 mg/ml for 4 h. Thereafter, 75 μ l of the medium was carefully removed from each well and the remaining MTT-formazan crystals were dissolved by adding 50 μ l of DMSO. The color that developed was read at 540 nm against a blank sample (without cells) using BioTek synergy HT microplate reader.

Cell Cytotoxicity Assay

The loss of plasma membrane integrity accompanying cell death was determined by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium. LDH activity was monitored by the reduction of a tetrazolium salt (pale yellow) to formazan (red). LDH activity was measured using a cytotoxicity detection kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), and the assay was conducted according to the protocol supplied by the manufacturer.

Detection of Apoptosis by Flow Cytometry

The percentage of living and dead cells was assessed by Annexin V/Hoechst 33258 staining followed by flow cytometric analysis. For this purpose, cells were seeded into six-well plates. After treatment with drugs culture media was removed, attached cells were released with trypsin and washed twice with PBS by centrifugation ($200\times g$ for 5 min at 4 °C). Approximately 1.5×10^5 cells were stained with Dyomics 647-labeled Annexin V according to the manufacturer's protocol (Apronex Biotechnologies). Then the cells were washed twice in Annexin binding buffer, stained with Hoechst 33258 (1:6000), and 104 events of every sample were analyzed on a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). The final evaluation of results was carried out with GateLogic 400.2A software (Invai, Mentone, Australia).

Assessment of Total Antioxidant Capacity

This assay is based on the ability of antioxidants present in the sample to prevent oxidation of 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzothiazoline sulfonate] (ABTS) by metmyoglobin. The resulting decrease in the absorbance at 405 nm is proportional to antioxidant concentration. Total antioxidant capacity of cellular homogenates was measured using a commercially available antioxidant assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), according to the supplier's instructions. The assay was calibrated with trolox, and the results were expressed in terms of micromoles of Trolox equivalents per liter ($\mu\text{mol Trolox Equiv/L}$).

Measurement of Intracellular ROS by Flow Cytometry

The amount of intracellular ROS was measured using the oxidant-sensing fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$). The nonpolar $\text{H}_2\text{DCFH-DA}$ can enter the cells where it becomes deacetylated to the polar derivative 2',7'-dichlorohydrofluorescein DCFH by cellular esterases, and this nonfluorescent product is switched to highly fluorescent DCF when oxidized by ROS. Cells grown

in six-well plates were loaded with $10 \mu\text{M H}_2\text{DCF-DA}$ for 30 min at 37 °C and subsequently treated with morphine and *t*-BHP according to the treatment protocol. After incubation with drugs culture media was removed, attached cells were released with trypsin, washed twice with PBS by centrifugation ($200\times g$ for 5 min at 4 °C), and immediately analyzed on a BD LSR II flow cytometer. The final evaluation of results was carried out with GateLogic 400.2A software.

Protein Carbonyl Formation

Carbonyl content was determined by the derivatization of protein carbonyl groups with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) leading to the formation of stable dinitrophenylhydrazone (DNP) adducts, which can be detected spectrophotometrically [26]. The cells were lysed in lysis buffer (0.1 M Tris-HCl, 1% w/v SDS; pH 6.8) in the presence of protease inhibitors and sonicated using a Bandelin Sonopuls HD 2070 ultrasonic homogenizer (GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) for three cycles of 20 s on and 20 s off at 80% amplitude on ice. Cell debris were pelleted ($10,000\times g$, 15 min, 4 °C), and the collected supernatant was tested for the presence of nucleic acid contamination by measuring absorbance at 260 and 280 nm [27]. The concentration of carbonyl groups was determined by the colorimetric protein carbonylation assay described earlier [28].

Analysis of Lipid Peroxidation

The amount of lipid peroxides in cell homogenates was determined by measuring so-called thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The determination of TBARS is a well-established method for monitoring lipid peroxidation utilizing the reaction between malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation, and thiobarbituric acid (TBA). This measurement was conducted according to the TBARS assay protocol described by Stöhr et al. [29], using 1,3,3-tetramethoxypropane as standard. The MDA-TBA product formed was measured colorimetrically at 535 nm.

Electrophoresis and Immunoblotting

Detection of the levels of selected proteins was performed by electrophoresis and immunoblotting. After treatment with drugs, cells were scraped and collected by centrifugation ($510\times g$ for 10 min at 4 °C). Pellet was resuspended in TMES buffer (20 mM Tris, 3 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 250 mM sucrose; pH 7.4) in the presence of protease and phosphatase inhibitors and homogenized with the aid of a 1-ml tuberculin syringe with a 22-gauge needle (20 strokes). Cell homogenates were solubilized in Laemmli buffer and loaded (20 μg per line) on standard 10 or 15% polyacrylamide gels for SDS-PAGE. After electrophoresis, the resolved proteins

were transferred onto a nitrocellulose membrane. After blocking in 5% nonfat dry milk or 5% bovine serum albumin (for phosphorylated forms of proteins) in TBS buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 8.0) containing 1% (v/v) Tween 20 for 1 h at room temperature, membranes were incubated with primary rabbit polyclonal antibodies against Bcl-2, Bax, p38 α , phospho-p38 (Thr 180/Tyr 182), GSK-3 β , phospho-GSK-3 β (pSer9), catalase, and SOD1 on an orbital shaker at 4 °C overnight. After three 10-min washes in TBS-Tween, the secondary donkey anti-rabbit IgG labeled with horseradish peroxidase (GE Healthcare) was applied for 1 h at room temperature. After another three 10-min washes in TBS-Tween, the blots were visualized by enhanced chemiluminescence technique according to the manufacturer's instructions (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). The immunoblots were scanned and quantitatively analyzed by ImageQuantTM TL software (Amersham Biosciences). Ponceau staining of nitrocellulose membranes was used to check equal loading of total proteins and for data normalization.

Protein Determination

Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid assay [30]. Samples were incubated at 37 °C for 30 min before analysis on BioTek synergy HT microplate reader at 562 nm.

Statistical Analysis

All results were expressed as the mean \pm SEM. Data for analysis were obtained from at least three independent experiments. Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test. For each comparison, differences were considered statistically significant at $P \leq 0.05$.

Results

Effect of Morphine and *t*-BHP on Cell Viability

In our initial experiments, we investigated the effect of different doses of morphine on H9c2 cells. Morphine was added to the cell culture medium at concentrations ranging from 1 μ M to 1 mM. After incubation for 15 h at 37 °C, cytotoxicity and cell viability were assessed using the LDH and MTT assays, respectively. Even when used at the highest concentrations (1 mM), morphine did not negatively affect cell viability. By contrast, addition of *t*-BHP caused a dose-dependent decrease in cell viability (Fig. 1).

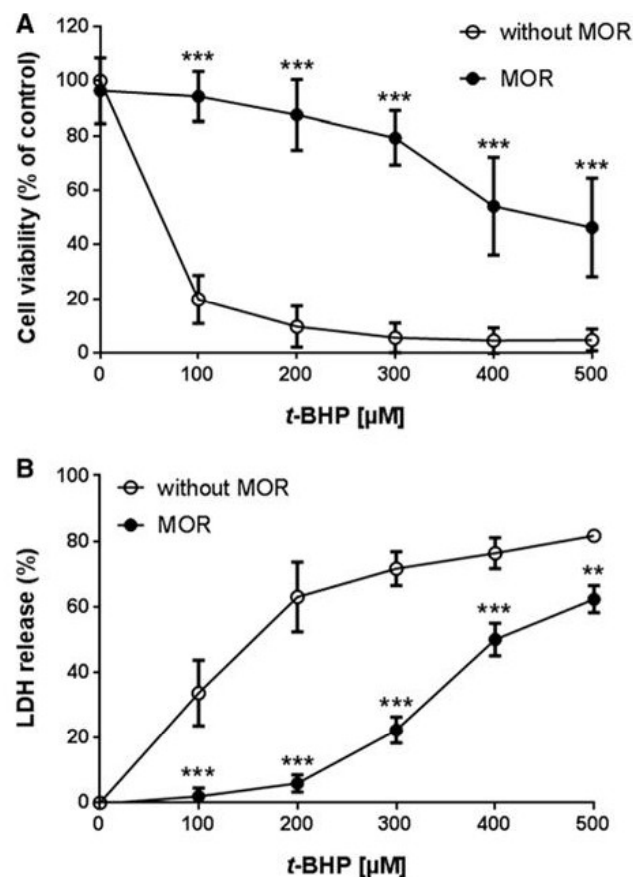


Fig. 1 Effects of morphine and *t*-BHP on cell viability. H9c2 cells were either not treated (without MOR) or treated with 1 mM morphine (MOR) and subsequently incubated in the presence of increasing concentrations of *t*-BHP as described in *Materials and Methods*. Cell viability and cytotoxicity were assessed by MTT (a) and LDH (b) assays, respectively. In MTT assay, the absorbance of MTT-formazan dissolved in DMSO was read at 540 nm using a microplate reader and LDH activity was determined by spectrophotometric absorbance at 490 nm. Data were expressed as percentages of the untreated control (100%). Values are mean \pm S.E.M. ($n = 5$); ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus corresponding morphine-untreated cells

Protective Effect of Morphine Against *t*-BHP-Induced Cell Damage

As stated above, morphine per se did not exert any significant effects on cell viability, but pretreatment of H9c2 cells with this drug markedly enhanced resilience of these cells to the harmful effect of *t*-BHP (Fig. 1). Interestingly, high doses of morphine were able to preserve cell viability even in the presence of very high *t*-BHP concentrations. Whereas only about 5% of cells remained viable after treatment with 500 μ M *t*-BHP, addition of 1 mM morphine increased the proportion of viable cells to about 49%. Lower concentrations of morphine (below 1×10^{-5} M) did not yield such a prominent cytoprotective effect. In most subsequent

experiments, *t*-BHP was used at a concentration of 300 μ M. Higher *t*-BHP concentrations did not incur more severe cellular damage.

The cytoprotective effect of morphine was further corroborated by flow cytometric determination of cell apoptosis and necrosis using Annexin V/Hoechst 33258 staining (Fig. 2a). These measurements indicated that the viability

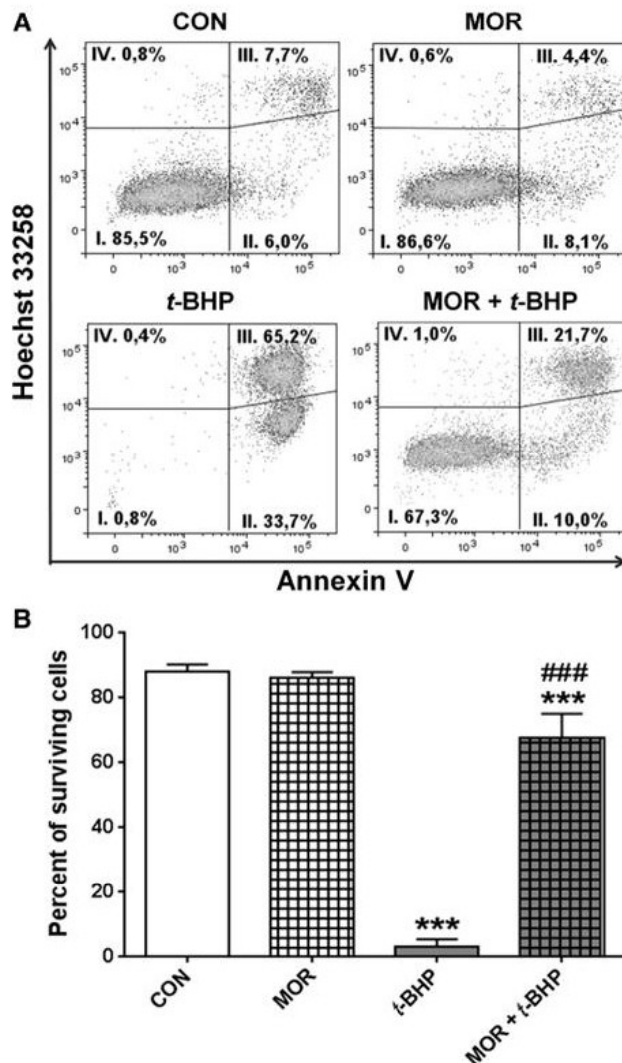


Fig. 2 Ameliorating effect of morphine on *t*-BHP-induced apoptotic cell death. H9c2 cells were either not treated (CON) or treated with 1 mM morphine (MOR) or 300 μ M *t*-BHP (*t*-BHP), or incubated in the presence of both these agents (MOR + *t*-BHP) as described in *Materials and Methods*. The proportion of alive and apoptotic/dead cells was estimated by Annexin V/Hoechst 33258 dual staining and flow cytometry. Representative dot plots show the distinct populations of viable cells (Annexin V⁻/Hoechst 33258⁻, Q_I), early apoptotic (Annexin V⁺/Hoechst 33258⁻, Q_{II}), late apoptotic (Hoechst 33258⁺/Annexin V⁺, Q_{III}), and necrotic (Hoechst 33258⁺/Annexin V⁻, Q_{IV}) cells (a). Graphs show the proportion of surviving cells (expressed as a percentage of the total cell number) under different conditions. Values are mean \pm S.E.M. ($n = 5$); *** $P < 0.001$ versus control, ### $P < 0.001$ versus *t*-BHP

of H9c2 cells cultured under normal conditions was about 88% and that treatment with 1 mM morphine did not markedly change cell viability (Fig. 2b). Moreover, addition of morphine to the culture medium considerably improved cell resilience to oxidative stress induced by *t*-BHP. Whereas 15 h of incubation with 300 μ M *t*-BHP caused a 96% decrease in cell viability, pretreatment of H9c2 cells with morphine efficiently forestalled such a devastating damage (Fig. 2b). In this case, cell viability dropped only slightly to about 67%.

Effect of Morphine on Total Antioxidant Capacity and Oxidative Stress in Cells Affected by *t*-BHP

First, we investigated the impact of 1 mM morphine on total antioxidant capacity of H9c2 cells using the ABTS decolorization assay. Treatment of cells with morphine resulted in a marked increase (by about 64%) in total antioxidant capacity. Contrarily, 300 μ M *t*-BHP significantly reduced (by about 35%) total antioxidant capacity. Interestingly, the observed increase in total antioxidant capacity of H9c2 cells induced by morphine treatment remained preserved even in the presence of *t*-BHP (Fig. 3).

The generation of intracellular ROS was measured by flow cytometry using DCF as a fluorescence probe (Fig. 4a). Exposure of H9c2 cells to 300 μ M *t*-BHP resulted in a considerable increase (by about 155%) in DCF fluorescence, indicating the presence of elevated levels of ROS. On the

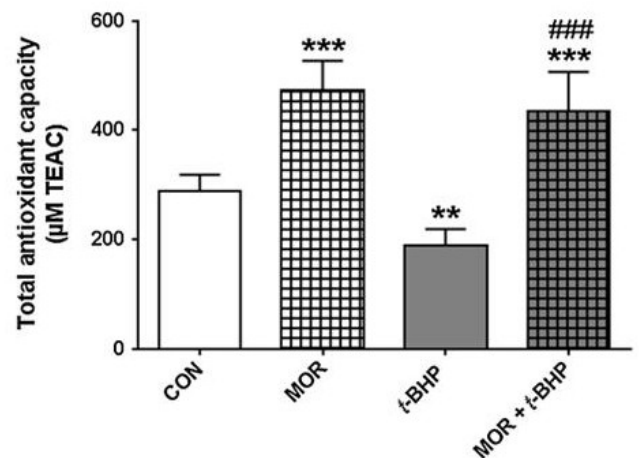


Fig. 3 Effects of morphine and *t*-BHP on total antioxidant capacity. H9c2 cells were either not treated (CON) or treated with 1 mM morphine (MOR) or 300 μ M *t*-BHP (*t*-BHP), or incubated in the presence of both these agents (MOR + *t*-BHP) as described in *Materials and Methods*. Total antioxidant capacity of cellular homogenates was then determined by the bleaching of preformed ABTS radical cations. Trolox was used as a reference standard and the results expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, μ mol/L Trolox). Values are presented as mean \pm S.E.M. ($n = 5$); ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus control, ### $P < 0.001$ versus *t*-BHP

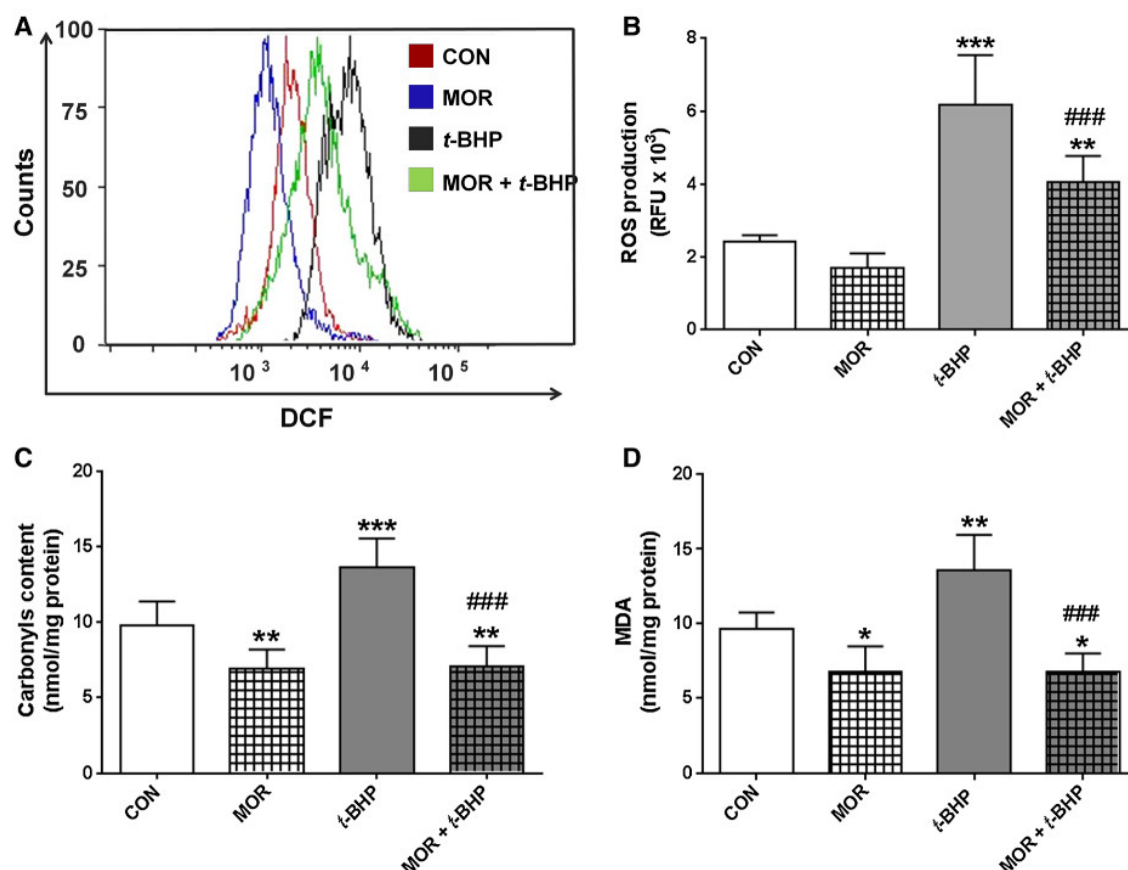


Fig. 4 Effects of morphine and *t*-BHP on intracellular ROS generation and levels of oxidative stress markers. H9c2 cells were either not treated (CON) or treated with 1 mM morphine (MOR) or 300 μ M *t*-BHP (*t*-BHP), or incubated in the presence of both these agents (MOR + *t*-BHP) as described in *Materials and Methods*. The intracellular levels of ROS were determined by flow cytometry using H₂DCFH-DA as the probe. Representative histogram of DCF fluorescence intensity (**a**) and bar graph showing DCF-detectable ROS

levels (expressed in relative fluorescence units) in H9c2 cells under different conditions (**b**). The carbonyl content was calculated from the absorbance of the protein-DNT derivative at 370 nm (**c**) and the lipid peroxidation was monitored by colorimetric measurement of MDA at 535 nm (**d**). Values are presented as mean \pm S.E.M. ($n = 7$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus control, ### $P < 0.001$ versus *t*-BHP

other hand, morphine significantly attenuated the production of ROS, which was reflected by a decrease (by about 30%) in DCF fluorescence. Furthermore, this drug turned out to be able to achieve a very high degree of reduction (by about 34%) of the elevated level of DCF fluorescence caused by 300 μ M *t*-BHP (Fig. 4b).

Next, we were interested to find out whether morphine can affect the extent of oxidative cell damage. Oxidative damage was assessed by measuring protein carbonyl content and lipid peroxidation (determination of TBARS). Treatment with 1 mM morphine significantly lowered (by 30%) the levels of protein carbonylation (Fig. 4c), as well as lipid peroxidation (Fig. 4d). Consistently with previous results, the addition of 300 μ M *t*-BHP to H9c2 cells led to increased lipid and protein oxidation; the extent of lipid peroxidation and protein carbonylation increased by about 40 and 39%, respectively. Importantly, pretreatment of cells

with morphine completely prevented the harmful impact of *t*-BHP.

Effect of Morphine and *t*-BHP on the Expression of Bcl-2 and Bax Proteins

To evaluate the effect of morphine and *t*-BHP on the sensitivity of H9c2 cells to apoptosis, the expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-2 and pro-apoptotic protein Bax were determined using immunoblotting (Fig. 5a, b). Whereas treatment with *t*-BHP markedly suppressed (by about 46%) Bcl-2 and increased (by about 87%) Bax expression, morphine did not affect Bcl-2 and decreased (by about 21%) Bax expression. In addition, morphine completely abolished the effect of *t*-BHP and maintained the expression of both Bcl-2 and Bax at the control level. Thus, the Bcl-2/Bax ratio

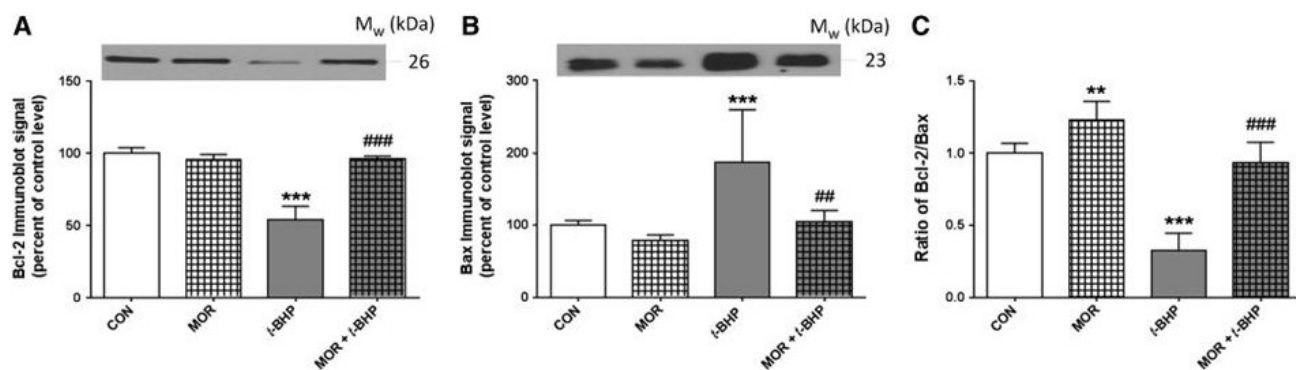


Fig. 5 Effects of morphine and *t*-BHP on Bcl-2 and Bax expression. H9c2 cells were incubated in the absence (CON) or presence either of 1 mM morphine (MOR), 300 μ M *t*-BHP (*t*-BHP) or both these agents (MOR + *t*-BHP) as described in *Materials and Methods*. Cells were harvested after 15 h and immunoblot analyses were performed using Bcl-2 (a) and Bax (b) specific antibodies. The blots

are representatives of five independent experiments. Bcl-2 and Bax band intensities were measured by densitometry and normalized to total protein levels. The ratios of Bcl-2 to Bax obtained under different experimental conditions were plotted (c). Values are presented as mean \pm S.E.M. ($n = 5$); ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus control, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus *t*-BHP

substantially decreased or increased after treatment of H9c2 cells with morphine or *t*-BHP, respectively (Fig. 5c).

Analysis of the p38 MAPK and GSK-3 β Pathways

To explore the effect of morphine and *t*-BHP on the p38 MAPK and GSK-3 β pathways, total expression of p38 and GSK-3 β , as well as changes in their phosphorylation state were monitored by immunoblotting (Fig. 6). The results were expressed as the ratio of phosphorylated p38 to total

p38 (phospho-p38/p38) and phosphorylated GSK-3 β to total GSK-3 β (phospho-GSK-3 β /GSK-3 β). Morphine treatment of H9c2 cells did not affect total expression of either p38 or GSK-3 β , but increased phosphorylation of p38 (Thr 180, Tyr 182) by about 128%. Phosphorylation of GSK-3 β (Ser 9) was not changed under these conditions. Although incubation of cells in the presence of *t*-BHP substantially diminished phosphorylation of both p38 and GSK-3 β , treatment of cells with morphine prior to the addition of *t*-BHP reversed the phosphorylation state of these two proteins. In other words,

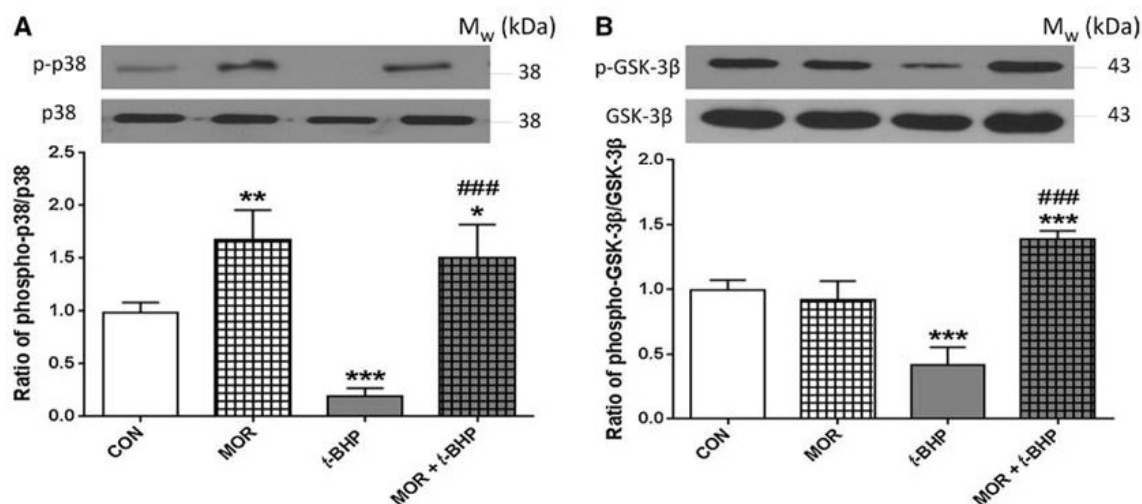


Fig. 6 Effects of morphine and *t*-BHP on p38 MAPK and GSK-3 β expression. H9c2 cells were incubated in the absence (CON) or presence either of 1 mM morphine (MOR), 300 μ M *t*-BHP (*t*-BHP) or both these agents (MOR + *t*-BHP) as described in *Materials and Methods*. Cells were harvested after 15 h and immunoblot analyses were performed using p38 and phospho-p38 (a) or GSK-3 β and phospho-GSK-3 β (b) specific antibodies. The blots are representatives of four independent experiments. Intensities of the bands cor-

responding to the phosphorylated and nonphosphorylated forms of p38 and GSK-3 β were measured by densitometry and normalized to total protein levels. Graphs show the ratios of phospho-p38 to total p38 and phospho-GSK-3 β to GSK-3 β obtained under different experimental conditions. Values are presented as mean \pm S.E.M. ($n = 4$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus control, *** $P < 0.001$ versus *t*-BHP

the morphine-induced increase in phospho-p38 level was not affected by *t*-BHP (Fig. 6a) and, intriguingly, morphine in combination with *t*-BHP markedly enhanced (by about 21%) the level of phospho-GSK-3 β (Fig. 6b).

Finally, we wanted to test whether the protective effect of morphine is mediated through the p38 MAPK and/or PI3K/GSK-3 β pathways. In these experiments, H9c2 cells were preincubated either with the p38 MAPK inhibitor SB203580 (10 μ M), or with the PI3K inhibitor wortmannin (1 μ M), or with a combination of both these inhibitors for 1 h before the addition of morphine and *t*-BHP. While treatment with SB203580, wortmannin, or both these inhibitors together has no toxic effect on cultured H9c2 cell in terms of cell viability (data not shown), preincubation with these compounds, either individually or in combination, markedly attenuated (by about 45–74%) the protective effect of morphine against oxidative damage caused *t*-BHP (Fig. 7). Importantly, the combined application of SB203580 and wortmannin resulted in a significantly greater attenuation of morphine-induced cytoprotection than that observed when these inhibitors were added individually.

Effect of Morphine of on Selected Antioxidant Enzymes

Expression levels of the key antioxidant enzymes, namely catalase and superoxide dismutase 1 (SOD1), in control H9c2 cells and in cells treated with morphine were determined by immunoblotting (Fig. 8). Whereas exposure to morphine resulted in a marked upregulation of catalase (by about 40%), the expression level of SOD1 was not significantly changed.

Discussion

It was reported earlier that treatment of H9c2 cells with *t*-BHP may lead to increased oxidative stress and result in apoptotic and necrotic cell death [24]. It was also found that opioids including morphine may confer protection against oxidative injury in some cells and tissues [6, 7]. However, it is currently not known whether morphine is able to protect against oxidative stress elicited by *t*-BHP and what kind of molecular mechanisms may possibly underlie its action. Therefore, the present study aimed to explore these issues. We observed that exposure of H9c2 cells to increasing concentrations (100–500 μ M) of *t*-BHP resulted in a dose-dependent decrease in cell viability and a concomitant

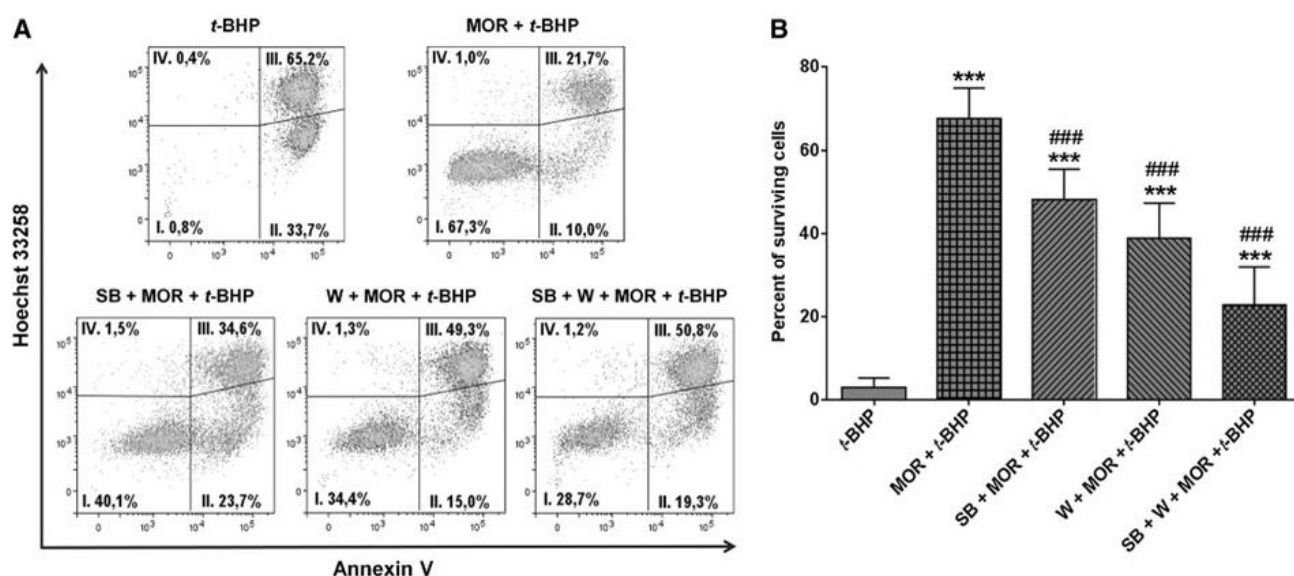


Fig. 7 Inhibitory effects of p38 MAPK and PI3K blockade on the morphine-mediated protection against *t*-BHP-induced cell damage. Before incubating with 300 μ M *t*-BHP (*t*-BHP), H9c2 cells were either not treated or treated with 1 mM morphine (MOR). In some cases, cells were pretreated with 10 μ M SB203580 (SB) or 1 μ M wortmannin (W) or both these inhibitors as described in *Materials and Methods*. Treatment with both these inhibitors either separately or in combination did not affect cell survival (data not shown). The proportion of alive and apoptotic/dead cells was estimated by

Annexin V/Hoechst 33258 dual staining and flow cytometry. Representative dot plots show the distinct populations of viable cells (Annexin V–/Hoechst 33258–, Q_I), early apoptotic (Annexin V+/Hoechst 33258–, Q_{II}), late apoptotic (Hoechst 33258+/Annexin V+, Q_{III}) and necrotic (Hoechst 33258+/Annexin V–, Q_{IV}) cells (a). Graphs show the proportion of surviving cells (expressed as a percentage of the total cell number) under different conditions. Values are mean \pm S.E.M. ($n = 5$); *** $P < 0.001$ versus *t*-BHP, ### $P < 0.001$ versus MOR + *t*-BHP

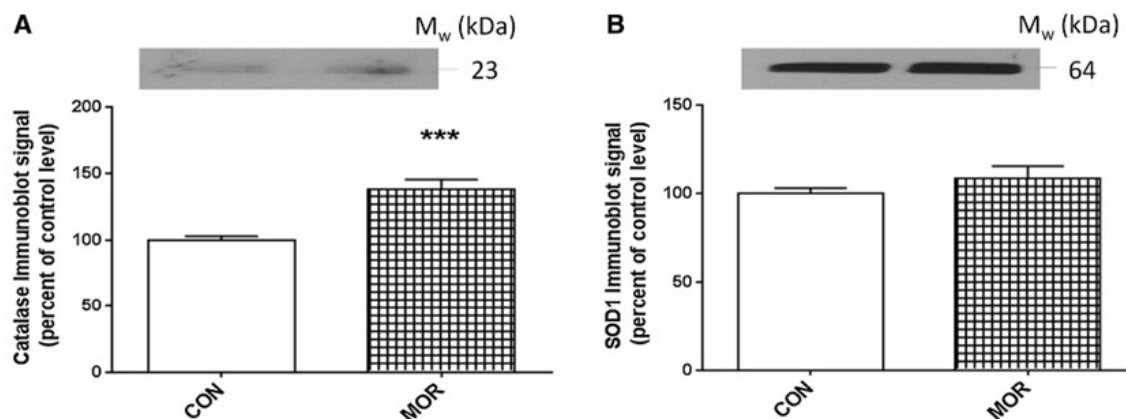


Fig. 8 Effect of morphine on catalase and superoxide dismutase 1 (SOD1) expression. After incubation for 15 h in the absence (CON) or presence of 1 mM morphine (MOR), H9c2 cells were harvested and immunoblot analyses were performed using catalase (a) or SOD1 (b) specific antibodies. The blots are representatives of four inde-

pendent experiments. Intensities of the bands corresponding to catalase and SOD1 were measured by densitometry and normalized to total protein levels. Values are presented as mean \pm S.E.M. ($n = 4$); *** $P < 0.001$ versus control

dose-dependent increase in cell death. Morphine (even at 1 mM concentration) did not negatively impact cell viability, but it markedly reduced the adverse effect of *t*-BHP. Furthermore, this drug was found to act as a strong antioxidant agent. Morphine markedly enhanced total antioxidant capacity of H9c2 cells and prevented the increase in ROS generation, protein carbonylation as well as lipid peroxidation that would have otherwise occurred in the presence of *t*-BHP.

We tested different concentrations (ranging from 1 μ M to 1 mM) of morphine for their cytoprotective potency. Although there are some studies showing that high doses of morphine can induce oxidative stress and apoptosis in different cell types [31–33], the highest morphine concentration (1 mM) proved to be the most effective in providing cytoprotection in our experimental conditions. In essence, these data agree well with previous findings of Hargrave et al. [20]. These authors reported that incubation of H9c2 cells with morphine (1 μ M–10 mM) did not lead to increased ROS production. Likewise, it has been observed that treatment of isolated rat liver cells with 1 mM morphine decreased H_2O_2 formation and lipid peroxidation [34]. Hence, studies dealing with the relationship between morphine and cellular oxidative state provide rather contradictory results. Morphine cannot be easily considered as a pro-oxidant or antioxidant compound because different factors, such as dosage, exposure time, tissue type and species, may affect the outcome of morphine treatment [19]. Interestingly, heroin (a closely related morphine derivative) increased the production of ROS and oxidative damage of proteins and lipids in the brain and liver but not in the heart, indicating better tolerance of opioids by heart tissue [35]. These findings are supported by results of proteomic analysis of the rat heart after prolonged morphine

exposure which did not reveal any significant alternations in the levels of several proteins involved in the control of cellular redox state (superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1 and SOD2), glutathione-peroxidase 4 isoform A precursor, peroxiredoxins Prx 2, Prx 3, Prx 5 and Prx 6, catalase, and some others) [36]. On the other hand, prolonged morphine exposure decreased the expression of SOD1, SOD2, and glutathione in the rat brain [37, 38] and the level of glutathione in the mouse liver [39]. By contrast, Arabian et al. [40] recently described increased catalase activity in hippocampal CA1 neurons after chronic morphine preconditioning. Similarly, here we observed that treatment of H9c2 cells by morphine resulted in increased rather than decreased expression of catalase. Concomitantly, the expression of SOD1 was not significantly changed. These data provide further support to the notion that the effects of morphine are highly dependent on tissue and other experimental conditions.

Recently, it has been reported that morphine, when used at common therapeutic (analgesic) concentrations ($\sim 1 \mu$ M), may also contribute to minimizing oxidative stress and cell death in glioma cells [41, 42] and H9c2 cells [21], as well as in HL-1 cells (mouse atrial cardiomyocyte cell line) and isolated rat cardiomyocytes [43]. However, cell injury induced by oxidative stress in all these experiments was significantly less prominent than that in our experimental conditions where treatment with *t*-BHP decreased the number of viable cells in a population by about 97%. It can be assumed that lower morphine concentrations may be sufficient to prevent the adverse consequences of mild oxidative stress in H9c2 cells, but cell damage caused by harsh oxidative stress conditions can be efficiently ameliorated only by higher morphine doses.

There is some evidence to suggest that activation of the p38 MAPK signaling pathway can be implicated in the development of a cardioprotective phenotype upon opioid-mediated preconditioning [13, 14]. In the present study, we decided to evaluate the potential role of this signaling pathway in morphine-induced cellular resistance to oxidative stress elicited by *t*-BHP. Treatment of H9c2 cells with morphine markedly enhanced phosphorylation of p38 MAPK and abolished the suppressive effect of *t*-BHP on its activity, indicating the ability of morphine to upregulate this signaling pathway. This conclusion has been further corroborated by the finding that morphine's protective effect on cell survival could be abrogated in the presence of the p38 MAPK inhibitor SB203580. These observations are consistent with data obtained by Zhang et al. [15], who identified the p38 MAPK pathway as an important mediator of morphine-induced preconditioning in vivo. It is interesting to note that the consequences of p38 MAPK activation on cell viability can be time dependent. Whereas p38 MAPK activation before ischemia was found to be protective [13–15], activation of this enzyme during a period of reperfusion resulted in increased tissue damage [44].

There are some indications that PI3K-mediated inactivation of GSK-3 β can also participate in the molecular mechanism of morphine-induced cardioprotection [8, 11]. GSK-3 β is a crucial regulator of cellular function as it plays a key role in pro-survival signaling. Inhibition of GSK-3 β is important for the prevention of mPTP opening that could otherwise lead to the impairment of mitochondrial respiratory function and excessive ROS production [11, 12]. Here we observed that incubation of H9c2 cells in the presence of both morphine and *t*-BHP resulted in increased phosphorylation of GSK-3 β on Ser 9, thereby inhibiting kinase activity, and maintaining high cell viability. In line with this, the addition of the PI3K inhibitor wortmannin to the culture medium significantly diminished the protective effect of morphine against *t*-BHP-induced cell damage. Intriguingly, concomitant application of SB203580 and wortmannin further reduced the ability of morphine to confer cytoprotection, when compared to the individual inhibitory effects of these two compounds. These data imply that both the p38 MAPK and PI3K/GSK-3 β signaling pathways play a role in morphine-induced cytoprotection. In this context, it is also worth mentioning that activation of p38 MAPK in MEF cells (mouse embryonic fibroblasts) increased catalase and SOD levels, diminished ROS accumulation and promoted cell survival [45]. Interestingly, these data fit well with our current findings.

Apoptosis regulator proteins Bcl-2 and Bax seem to exert distinct effects on the mPTP. Whereas the pro-apoptotic Bax protein facilitates outer membrane permeability of the mPTP, thereby leading to necrotic cell death [46], interaction of the anti-apoptotic Bcl-2 protein with the mPTP renders

the pore more resistant to opening [47]. Therefore, preservation of a favorable ratio of Bcl-2 and Bax is critically important for controlling cell survival. Here we found that treatment of H9c2 cells with *t*-BHP decreased Bcl-2 and increased Bax expression. Morphine treatment abolished the detrimental effect of *t*-BHP and maintained the Bcl-2/Bax ratio similar to that in control untreated cells. Similar results were recently reported by Amini-Khoei et al. [21], who demonstrated that morphine was able to substantially restore the levels of Bcl-2 and Bax that were found to be significantly altered upon treatment of H9c2 cells with arsenic trioxide.

Collectively, our data support previous studies that highlight the importance of opioid preconditioning in cellular functions. We have shown that morphine can confer a strong protection against oxidative stress caused by *t*-BHP in H9c2 cells and that this protection is at least partially mediated through the p38 MAPK and PI3K/GSK-3 β cascades. Our findings suggest that activation of these signaling pathways is required to trigger the defense reaction antagonizing oxidative stress by mechanisms involving the upregulation of catalase, as well as the modulation of Bcl-2 family proteins. However, the complete molecular mechanism that coordinates these events remains to be determined.

Acknowledgements This study was supported by the Charles University Grant Agency (Grant No. 361615) and Institutional Project SVV-260434/2017.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Flemming, K. (2010). The use of morphine to treat cancer-related pain: A synthesis of quantitative and qualitative research. *Journal of Pain and Symptom Management*, 39(1), 139–154. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2009.05.014>.
2. Ballantyne, J. C. (2008). Medical use of opioids: What drives the debate? A brief commentary. *European Journal of Pain Supplements*, 2(1), 67–68. [https://doi.org/10.1016/S1754-3207\(08\)70068-3](https://doi.org/10.1016/S1754-3207(08)70068-3).
3. Ballantyne, J. C. (2015). Opioid therapy in chronic pain. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 26(2), 201–218. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2014.12.001>.
4. Schultz, J. E. J., Hsu, A. K., & Gross, G. J. (1996). Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circulation Research*, 78(6), 1100–1104.
5. Schultz, J. E. J., & Gross, G. J. (2001). Opioids and cardioprotection. *Pharmacology & Therapeutics*, 89(2), 123–137. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(00\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00106-6).
6. Williams-Pritchard, G., Headrick, J. P., & Peart, J. N. (2011). Myocardial opioid receptors in conditioning and cytoprotection. *Pharmaceuticals (Basel)*, 4(3), 470–484. <https://doi.org/10.3390/ph4030470>.

7. Headrick, J. P., See Hoe, L. E., Du Toit, E. F., & Peart, J. N. (2015). Opioid receptors and cardioprotection—"opioidergic conditioning" of the heart. *British Journal of Pharmacology*, 172(8), 2026–2050. <https://doi.org/10.1111/bph.13042>.
8. Gross, E. R., Hsu, A. K., & Gross, G. J. (2004). Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase β inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circulation Research*, 94(7), 960–966.
9. Gross, E. R. (2006). The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 β . *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 291(2), H827–H834. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00003.2006>.
10. Xi, J., Tian, W., Zhang, L., Jin, Y., & Xu, Z. (2010). Morphine prevents the mitochondrial permeability transition pore opening through NO/cGMP/PKG/Zn²⁺/GSK-3 β signal pathway in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 298(2), H601–H607. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00453.2009>.
11. Obame, F. N., Plin-Mercier, C., Assaly, R., Zini, R., Dubois-Randé, J. L., Berdeux, A., et al. (2008). Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 β , SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(1), 252–258. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.138008>.
12. Juhaszova, M., Zorov, D. B., Kim, S.-H., Pepe, S., Fu, Q., Fishbein, K. W., et al. (2004). Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(11), 1535–1549. <https://doi.org/10.1172/JCI19906>.
13. Fryer, R. M., Hsu, A. K., & Gross, G. J. (2001). ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*, 96(2), 136–142.
14. Peart, J. N., Gross, E. R., Headrick, J. P., & Gross, G. J. (2007). Impaired p38 MAPK/HSP27 signaling underlies aging-related failure in opioid-mediated cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(5), 972–980. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.02.011>.
15. Zhang, Y., Gu, E., Zhang, J., & Chen, Z. (2007). Role of p38 mitogen-activated protein kinases in cardioprotection of morphine preconditioning. *Chinese Medical Journal*, 120(9), 777–781.
16. Becker, L. B. (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research*, 61(3), 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.10.025>.
17. Borges, R. S., Vale, J. K. L., Pereira, G. A. N., Veiga, A. A. S., Junior, J. B., & da Silva, A. B. F. (2016). An antioxidant mechanism of morphine and related derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 25(5), 852–857. <https://doi.org/10.1007/s00044-016-1532-z>.
18. Gülçin, I. (2004). In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 49(1), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2003.07.012>.
19. Skrabalova, J., Drastichova, Z., & Novotny, J. (2013). Morphine as a potential oxidative stress-causing agent. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 10(4), 367–372. <https://doi.org/10.2174/1570193X113106660031>.
20. Hargrave, B. Y., Tiangco, D. A., Lattanzio, F. A., & Beebe, S. J. (2003). Cocaine, not morphine, causes the generation of reactive oxygen species and activation of NF- κ B in transiently cotransfected heart cells. *Cardiovascular Toxicology*, 3(2), 141–151. <https://doi.org/10.1385/CT:3:2:141>.
21. Amini-Khoei, H., Hosseini, M.-J., Momeny, M., Rahimi-Balaei, M., Amiri, S., Haj-Mirzaian, A., et al. (2016). Morphine attenuated the cytotoxicity induced by arsenic trioxide in H9c2 cardiomyocytes. *Biological Trace Element Research*, 173(1), 132–139. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0631-5>.
22. Xu, J., Tian, W., Ma, X., Guo, J., Shi, Q., Jin, Y., et al. (2011). The molecular mechanism underlying morphine-induced Akt activation: Roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 61(2), 303–311. <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9213-5>.
23. Xu, J., Tian, W., Cui, S., Li, N., & Xu, Z. (2012). Morphine prevents oxidant stress-induced mitochondrial damage via an EGFR-TK-Ros-Akt mitochondrial signalling pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *Heart*, 98(Suppl 2), E19. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2012-302920a.41>.
24. Sardão, V. A., Oliveira, P. J., Holy, J., Oliveira, C. R., & Wallace, K. B. (2007). Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide—Characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biology*, 8, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-8-11>.
25. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
26. Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., et al. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186(C), 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h).
27. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329(1–2), 23–38. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2).
28. Vieira, A., Michels, M., Florentino, D., Lauriano, A. A., Daniel-ski, L. G., Fortunato, J. J., et al. (2014). Increased oxidative brain injury in the diabetic rats following sepsis. *Synapse*, 68(9), 410–418. <https://doi.org/10.1002/syn.21753>.
29. Stöhr, J., Novotny, J., Bourova, L., & Svoboda, P. (2005). Modulation of adenylyl cyclase activity in young and adult rat brain cortex. Identification of suramin as a direct inhibitor of adenylyl cyclase. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(4), 940–952.
30. Walker, J. M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology*, 32, 5–8.
31. Hatsukari, I., Hitosugi, N., Ohno, R., Hashimoto, K., Nakamura, S., Satoh, K., et al. (2007). Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines in vitro. *Anticancer Research*, 27(2), 857–864.
32. Lin, X., Wang, Y. J., Li, Q., Hou, Y. Y., Hong, M. H., Cao, Y. L., et al. (2009). Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of mitochondria-dependent pathway. *FEBS Journal*, 276(7), 2022–2036. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658>.
33. Eslami, H., & Sharifi, A. M. (2014). Effect of carnosine on the prevention of high-dose morphine-induced apoptosis of PC12 cells. *Journal of Medical and Bioengineering*, 3(3), 175–178.
34. Cunha-Oliveira, T., Silva, L., Silva, A. M., Moreno, A. J., Oliveira, C. R., & Santos, M. S. (2013). Acute effects of cocaine, morphine and their combination on bioenergetic function and susceptibility to oxidative stress of rat liver mitochondria. *Life Sciences*, 92(24), 1157–1164.
35. Pan, J., Zhang, Q., Zhang, Y., Ouyang, Z., Zheng, Q., & Zheng, R. (2005). Oxidative stress in heroin administered mice and natural antioxidants protection. *Life Sciences*, 77(2), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.12.025>.
36. Drastichova, Z., Skrabalova, J., Jedelsky, P., Neckar, J., Kolar, F., & Novotny, J. (2012). Global changes in the rat heart proteome induced by prolonged morphine treatment and

- withdrawal. *PLoS ONE*, 7(10), e47167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047167>.
37. Bierczynska-Krzsik, A., John, J. P. P., Silberring, J., Kotlinska, J., Dylag, T., Cabatic, M., et al. (2006). Proteomic analysis of rat cerebral cortex, hippocampus and striatum after exposure to morphine. *International Journal of Molecular Medicine*, 18(4), 775–784.
 38. Sumathi, T., Nathiya, V. C., & Sakthikumar, M. (2011). Protective effect of bacoside-A against morphine-induced oxidative stress in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(4), 409–415. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.95624>.
 39. Payabvash, S., Beheshtian, A., Salmasi, A. H., Kiumehr, S., Ghahremani, M. H., Tavangar, S. M., et al. (2006). Chronic morphine treatment induces oxidant and apoptotic damage in the mice liver. *Life Sciences*, 79(10), 972–980. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.05.008>.
 40. Arabian, M., Aboutaleb, N., Soleimani, M., Ajami, M., Habibey, R., & Pazoki-Toroudi, H. (2017). Activation of mitochondrial KATP channels mediates neuroprotection induced by chronic morphine preconditioning in hippocampal CA-1 neurons following cerebral ischemia. *Advances in Medical Sciences*, 63(2), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.11.003>.
 41. Almeida, M. B., Costa-Malaquias, A., Nascimento, J. L. M., Oliveira, K. R., Herculano, A. M., & Crespo-López, M. E. (2014). Therapeutic concentration of morphine reduces oxidative stress in glioma cell line. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(5), 398–402. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143697>.
 42. Costa-Malaquias, A., Almeida, M. B., Monteiro, J. R. S., de Matos Macchi, B., do Nascimento, J. L. M., & Crespo-Lopez, M. E. (2014). Morphine protects against methylmercury intoxication: A role for opioid receptors in oxidative stress? *PLoS ONE*, 9(10), e110815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110815>.
 43. He, H., Huh, J., Wang, H., Kang, Y., Lou, J., & Xu, Z. (2016). Mitochondrial events responsible for morphine's cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 290, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.11.019>.
 44. Chen, Z., Zhang, X., Liu, Y., & Liu, Z. (2016). Morphine post-conditioning protects against reperfusion injury via inhibiting JNK/p38 MAPK and mitochondrial permeability transition pores signaling pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(1), 61–70. <https://doi.org/10.1159/000445605>.
 45. Gutiérrez-Uzquiza, A., Arechederra, M., Bragado, P., Aguirre-Ghiso, J. A., & Porras, A. (2012). p38 α mediates cell survival in response to oxidative stress via induction of antioxidant genes: Effect on the p70S6K pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2632–2642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323709>.
 46. Karch, J., Kwong, J. Q., Burr, A. R., Sargent, M. A., Elrod, J. W., Peixoto, P. M., et al. (2013). Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *eLife*, 2, e00772. <https://doi.org/10.7554/eLife.00772>.
 47. Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., et al. (1998). The permeability transition pore complex: A target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(8), 1261–1271. <https://doi.org/10.1084/jem.187.8.1261>.